

## 明細書

## エストロゲンレセプター遺伝子及びその利用

## 技術分野

- 5           本発明は、エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

## 背景技術

- 10           近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロゲン様活性を示すことが報告され、例えばある種の化学物質による野生の魚類等の雌性化の報告がなされている (T.Colborn, D.Dumanoski and J.P.Myers 著: Our Stolen Future, 1996, Dutton, New York 発行)。かかる化学物質の活性はヒトを含めた各種生物のホルモンバランスを崩し、異常や疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロゲン様活性を測定する試みがなされている。

- 15           エストロゲンの標的細胞に存在するエストロゲンレセプターにエストロゲンが結合すると、当該エストロゲンレセプターは活性化されて染色体上のエストロゲン応答配列に結合し、そこへさらに、エストロゲンとエストロゲンレセプターとの複合体を認識する転写共役因子が結合して、当該エストロゲン応答配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロゲ
- 20           ン様活性を測定するための方法として、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能力を評価するための試験系の開発が求められており、当該試験系に利用することのできるエストロゲンレセプター遺伝子の取得が切望されている。

## 発明の開示

- 25           本発明者は、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物

でブルーギルからエストロゲンレセプター遺伝子を単離することに成功し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

- 1) 下記の (a) ～ (f) のいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子 (以下、本発明遺伝子と記す。)、
  - (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列
  - (b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列
  - (c) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列
  - (d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
  - (e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
  - (f) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列に対して 85% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
- 2) 下記の (g) ～ (i) のいずれかの塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、
  - (g) 配列番号 2 で示される塩基配列の塩基番号 424 ～ 1941 で表される塩基配列
  - (h) 配列番号 5 で示される塩基配列の塩基番号 74 ～ 1819 で表される塩基配列
  - (i) 配列番号 2 4 で示される塩基配列の塩基番号 106 ～ 1767 で表される塩基配列
- 3) 本発明遺伝子を含有するベクター (以下、本発明ベクターと記す。)、
- 4) 宿主細胞内で複製可能なベクターに本発明遺伝子を組込む工程を含有するベクターの製造方法、

- 5) 本発明遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、
- 6) 本発明遺伝子または本発明ベクターを宿主細胞に導入する工程を含有する形質転換体の製造方法、
- 5 7) 本発明形質転換体を培養する工程およびエストロゲンレセプターを産生させる工程を含有するエストロゲンレセプターの製造方法、
- 8) 本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNA、
- 9) 部分塩基配列が、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列である前項8記載のDNA、
- 10 10) 下記の（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、
  - （a）配列番号1で示されるアミノ酸配列
  - （b）配列番号4で示されるアミノ酸配列
  - （c）配列番号23で示されるアミノ酸配列
  - 15 （d）配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
  - （e）配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
  - （f）配列番号23で示されるアミノ酸配列に対して85%以上のアミノ酸同
  - 20 一性を示すアミノ酸配列
- 11) エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とが導入されている形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含有する被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法、

1 2) 前項 10 記載のエストロゲンレセプターと被験物とを接触させ保温する  
工程を含有するレセプターバインディングアッセイ、

1 3) リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子も  
しくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターとが  
5 リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性  
化されるツートハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプタ  
ー活性調節能を測定するための本発明遺伝子の使用、

1 4) リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子も  
しくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターのリ  
10 ガンド結合領域とがリガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター  
遺伝子の転写が活性化されるツートハイブリッドシステムにおいて、被験物のエ  
ストロゲンレセプター活性調節能を測定するための本発明遺伝子の部分塩基を  
有する DNA の使用  
を提供するものである。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、E2 のエ  
ストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸に  
は、各試験区における E2 の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、E2 の DMSO  
20 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (E2 無添加区) を示  
す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、E2 無添加区のルシフェラーゼ活性値  
を 1 として示す。

図 2 は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、ビスフ  
ェノール A のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図

である。横軸には、各試験区におけるビスフェノールAの濃度を付記した。左端の0のカラムは、ビスフェノールAのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（ビスフェノールA無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ビスフェノールA無添加区のルシフェラーゼ活性値を

5 1として示す。

図3は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、ジエチルstilbestロール（DES）のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果（N=6）を示す図である。横軸には、各試験区におけるDESの濃度を付記した。左端の0のカラムは、DESのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（DES無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、DES無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図4は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果（N=6）を示す図である。横軸には、各試験区におけるゲニステインの濃度を付記した。左端の0のカラムは、ゲニステインのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（ゲニステイン無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図5は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、o,p'-DDTのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果（N=6）を示す図である。横軸には、各試験区におけるo,p'-DDTの濃度を付記した。左端の0のカラムは、o,p'-DDTのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（o,p'-DDT無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、o,p'-DDT無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図6は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたレポーターアッセイにより、4-ヒ

ドロキシタモキシフェン (4-OH-HTM) のエストロゲンレセプター抗活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区において 10nM の E2 と共存させた 4-OH-HTM の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、4-OH-HTM の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (4-OH-HTM 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、4-OH-HTM 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 7 は、本発明遺伝子 bger  $\alpha 2$  を用いたレポーターアッセイにより、E2 のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区における E2 の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、E2 の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (E2 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、E2 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 8 は、本発明遺伝子 bger  $\alpha 2$  を用いたレポーターアッセイにより、ビスフェノール A のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるビスフェノール A の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、ビスフェノール A の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (ビスフェノール A 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ビスフェノール A 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 9 は、本発明遺伝子 bger  $\alpha 2$  を用いたレポーターアッセイにより、ジエチルスチルベステロール (DES) のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区における DES の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、DES の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (DES 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラー

ぜ活性値を、DES無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図10は、本発明遺伝子 bger  $\alpha 2$  を用いたレポーターアッセイにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるゲニステインの濃度を付記した。左端の0のカラムは、ゲニステインのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (ゲニステイン無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図11は、本発明遺伝子 bger  $\alpha 2$  を用いたレポーターアッセイにより、o,p'-DDTのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるo,p'-DDTの濃度を付記した。左端の0のカラムは、o,p'-DDTのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (o,p'-DDT無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、o,p'-DDT無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

図12は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたツーハイブリッドシステムにより、E2、エストロン、エストリオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=4) を示す図である。横軸には、化合物の濃度を付記した。縦軸には、 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性値を、化合物無添加区の $\beta$ ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

図13は、本発明遺伝子 bger  $\alpha$  を用いたツーハイブリッドシステムにより、各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=4) を示す図である。横軸には、 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性値を、1nMのE2添加区の $\beta$ ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

図14は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、エストラジオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図であ

る。横軸には、各試験区におけるエストラジオールの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、エストラジオールの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（エストラジオール無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、エストラジオール無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 と  
5 して示す。

図 1 5 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、ジェチルスチルベステロール（DES）のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区における DES の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、DES の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（DES 無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活  
10 性値を、DES 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 1 6 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、p-ノニルフェノールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区における p-ノニルフェノールの濃度を付記した。左  
15 端の 0 のカラムは、p-ノニルフェノールの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（p-ノニルフェノール無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、p-ノニルフェノール無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 1 7 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、ビスフェノール A のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区におけるビスフェノール A の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、ビスフェノール A の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（ビスフェノール A 無添加区）を示す。縦軸には、ルシフ  
20 エラーゼ活性値を、ビスフェノール A 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 と



して示す。

- 図 1 8 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、ダイゼインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区におけるダイゼインの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、
- 5    ダイゼインの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（ダイゼイン無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ダイゼイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

- 図 1 9 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。
- 10    横軸には、各試験区におけるゲニステインの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、ゲニステインの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（ゲニステイン無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

- 図 2 0 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、クメステロールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。
- 15    横軸には、各試験区におけるクメステロールの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、クメステロールの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（クメステロール無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、クメステロール無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

- 20    図 2 1 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、o, p'-DDT のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区におけるゲニステインの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、o, p'-DDT の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区（o, p'-DDT 無添加区）を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、o, p'-DDT

無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 2 2 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたレポーターアッセイにより、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OH-HTM) のエストロゲンレセプター抗活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、各試験区において 10nM のエストラジオールと共存させた 4-OH-HTM の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、4-OH-HTM の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (4-OH-HTM 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、4-OH-HTM 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

図 2 3 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたツーハイブリッドアッセイにより、エストラジオール、エストロン、エストリオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸には、化合物の濃度を付記した。縦軸には、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性値を、化合物の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (化合物無添加区) の  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性値を 1 として示す。

図 2 4 は、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたツーハイブリッドアッセイにより、各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。縦軸には、化合物の濃度を付記した。横軸には、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性値を、エストラジオールを 1nM となるよう添加した区の  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性値を 1 として示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明遺伝子は、エストロゲンレセプターをコードする遺伝子である。本発明遺伝子としては、具体的には例えば、(a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸

配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、(b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、(c) 配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95 % 5 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、(e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、(f) 配列番号 23 で示されるアミノ酸配列に対して 85 % 以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコード 10 する遺伝子、(g) 配列番号 2 で示される塩基配列の塩基番号 424~1941 で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、(h) 配列番号 5 で示される塩基配列の塩基番号 74~1819 で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、(i) 配列番号 24 で示される塩基配列の塩基番号 106~1767 で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子等を 15 あげることができる。

ここで、「配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、約 400 アミノ酸残基以上からなる領域において配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と約 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるエストロゲンレセプターと実 20 質的に同等の特性のレセプター機能を有するエストロゲンレセプターをあげることができる。かかるエストロゲンレセプターのアミノ酸配列において認められる配列番号 1 で示されるアミノ酸配列とのアミノ酸の相違とは、アミノ酸の欠失、置換、付加等である。これらには、動物の系統、個体、器官、組織等の

違いに基づくアミノ酸配列の違いなどの天然に生ずる多型変異も含まれる。このようなエストロゲンレセプターをコードする遺伝子としては、天然の遺伝子であってもよいし、例えば、部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって、天然の遺伝子に変異を導入することにより作出された遺伝子であってもよい。

5 その同一性は、例えば、95%以上であることが好ましい。

ここで、「配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、約400アミノ酸残基以上からなる領域において配列番号4で示されるアミノ酸配列と約95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、

10 配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるエストロゲンレセプターと実質的に同等の特性のレセプター機能を有するエストロゲンレセプターをあげることができる。かかるエストロゲンレセプターのアミノ酸配列において認められる配列番号4で示されるアミノ酸配列とのアミノ酸の相違とは、アミノ酸の欠失、置換、付加等である。これらには、動物の系統、個体、器官、組織等の

15 違いに基づくアミノ酸配列の違いなどの天然に生ずる多型変異も含まれる。このようなエストロゲンレセプターをコードする遺伝子としては、天然の遺伝子であってもよいし、例えば、部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって、天然の遺伝子に変異を導入することにより作出された遺伝子であってもよい。

その同一性は、例えば、95%以上であることが好ましい。

20 ここで、「配列番号23で示されるアミノ酸配列に対して85%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、配列番号23で示されるアミノ酸配列と約85%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号23で示されるアミノ酸配列からなるエストロゲンレセプターと実質的に同等の特性のレセプター機能を有する蛋白質

をあげることができる。かかるエストロゲンレセプターのアミノ酸配列において認められる配列番号 23 で示されるアミノ酸配列とのアミノ酸の相違とは、アミノ酸の欠失、置換、付加等である。これらには、人為的に導入され得るアミノ酸変異に加えて、動物の系統、個体、器官、組織等の違いに基づくアミノ酸配列の違いなどの天然に生ずる多型変異も含まれる。このような蛋白質をコードする遺伝子としては、天然の遺伝子であってもよいし、例えば、部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって、天然の遺伝子に変異を導入することにより作出された遺伝子であってもよい。その同一性は、例えば、85%以上であることが好ましい。

本発明において「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列の配列の同一性及び相同性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象の配列の全領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象の塩基配列又はアミノ酸配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失（例えばギャップ等）を許容してもよい。このような配列同一性は、例えば、FASTA [Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 4, 2444-2448(1988)]、BLAST [Altschul ら、Journal of Molecular Biology, 215, 403-410(1990)]、CLUSTAL W [Thompson, Higgins & Gibson, Nucleic Acid Research, 22, 4673-4680(1994a)] 等のプログラムを用いて相同性解析を行いアラインメントを作成することによって算出することができる。上記のプログラムは、例えば、DNA Data Bank of Japan [国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター (Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan ;CIB/DDBJ) 内で運営される国際DNAデータバンク] のホームページ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 等において、一般的に利用可能である。また、配列同一性は、Vector NTI、GENETYX-WIN Ver. 5 (ソフトウェア開発株式会社製)

等の市販の配列解析ソフトウェアを用いて求めることもできる。

エストロゲンレセプター機能は、例えば、後述のレポーターアッセイ、ツ  
ーハイブリッドシステム、レセプターバインディングアッセイ等に基づき評価  
することができる。前記 (a)、(b)、(d)、(e)、(g) 及び (h) にある遺  
5 伝子は、一般に、エストロゲンレセプター  $\alpha$  機能を有する蛋白質をコードする  
ものである。前記 (c)、(f) 及び (i) にある遺伝子は、一般に、エストロ  
ゲンレセプター  $\beta$  機能を有する蛋白質をコードするものである。

本発明遺伝子は、例えば、魚類ブルーギル (学名: *Lepomis ce  
ntrarchidae*) 等の組織から、J. Sambrook, E. F. F  
10 risch, T. Maniatis 著; モレキュラー クローニング第2版 (*M  
olecular Cloning 2nd edition*)、コールドスプ  
リング ハーバー ラボラトリー (*Cold Spring Harbor  
Laboratory* 発行、1989年) 等に記載の遺伝子工学的方法に準じ  
て取得することができる。具体的には、まず、ブルーギルの組織由来の全RN  
15 Aを調製する。例えば、ブルーギルの肝臓等の組織を塩酸グアニジンやグアニ  
ジンチオシアネート等の蛋白質変性剤を含む溶液中で粉砕し、さらに該粉砕物  
にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性  
蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された上清画分から塩酸グアニジ  
ン/フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート/Cs  
20 Cl 法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市  
販のキットとしては、例えばISOGEN (ニッポンジーン製) やTrizol  
試薬 (Life Technologies 社製) がある。

得られた全RNAを鋳型としてオリゴdTプライマーをRNAのポリA配  
列にアニールさせ、逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成する。次いで該一

本鎖 cDNA を鋳型とし、かつ大腸菌 RNase H を用いて RNA 鎖にニックとギャップを入れることにより得られる RNA 断片をプライマーとして大腸菌の DNA ポリメラーゼ I を用いて二本鎖の cDNA を合成する。更に該二本鎖 cDNA の両末端を T4 DNA ポリメラーゼにより平滑化する。得られた cDNA はフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えば cDNA 合成システムプラス (アマシャムファルマシアバイオテク社製) や Time Saver cDNA 合成キット (アマシャムファルマシアバイオテク社製) 等がある。次に、得られた二本鎖 cDNA を例えば、プラスミド pUC118 やファージ  $\lambda$ gt10 などのベクターにリガーゼを用いて連結することにより cDNA ライブラリーを作製する。このような cDNA ライブラリーから、例えば、ハイブリダイゼーション法や、PCR 法により、本発明遺伝子を取得することができる。

前記 (a)、(b)、(d)、(e)、(g) 及び (h) にある遺伝子を取得する場合、cDNA ライブラリーから、例えば、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかで示される塩基配列の部分塩基配列を有する DNA をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかで示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR 法を利用することができる。

そのハイブリダイゼーション法に用いられるプローブとしては、例えば、配列番号 2 で示される塩基配列の塩基番号 424 ~ 483、871 ~ 924 または 1863 ~ 1881 で表される塩基配列を有する DNA や、配列番号 5 で示される塩基配列の塩基番号 182 ~ 217 で表される塩基配列を有する DNA 等があげられる。また、ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、

6×SSC (0.9M NaCl、0.09Mクエン酸ナトリウム)、5×デンハルト溶液 [0.1w/v%フィコール400、0.1w/v%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA]、0.5w/v%SDS及び100 µg/ml変性サケ精子DNA存在下、または100 µg/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液 (ベーリンガー・マンハイム社) 中で、65℃で保温し、次いで1×SSC (0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC (0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温する条件等をあげる事ができる。

そのPCR法に用いられるプライマーとしては、例えば、約20bpから約40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が約40%から約60%程度の塩基配列を、配列番号2または配列番号5のいずれかで示される塩基配列の5'非翻訳領域および3'非翻訳領域からそれぞれ選択し、5'非翻訳領域から選択した塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび3'非翻訳領域から選択した塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には例えば、フォワードプライマーとして配列番号6で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして配列番号7で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用する組み合わせがあげられる。PCRの条件としては、例えば、反応液50 µl中に、10x LATaq緩衝液 (宝酒造社製) 5 µl、2.5mM dNTP混合液 (各2.5mMのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTPを含む。) 8 µl (dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP各々の終濃度が0.4mM)、25mM MgCl<sub>2</sub>溶液5 µl、10 µMプライマー 各0.5~2.5 µl (終濃



度が 0.1 ~ 0.5  $\mu$ M)、鋳型 cDNA 0.1 ~ 1  $\mu$ g、L A T a q p o l y m e r a s e (宝酒造社製) 2.5 ユニットを含む組成の反応液にて、94℃で1分間次いで55℃で2分間更に72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを全30サイクル行う等の条件が挙げられる。

5        また、前記 (c)、(f) 及び (i) にある遺伝子を取得する場合、cDNA ライブラリーから、例えば、配列番号 24 で示される塩基配列の部分塩基配列を有する DNA をプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号 24 で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる PCR 法を利用することができる。

10        そのハイブリダイゼーション法に用いられるプローブとしては、例えば、配列番号 24 で示される塩基配列の塩基番号 166~261 または 1654~1800 で表される塩基配列のいずれかを有する DNA 等があげられる。また、ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、6×SSC (0.9M NaCl、0.09M クエン酸ナトリウム)、5×デンハルト溶液 (0.1%(w/v) フィコール 400、0.1%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.1%(w/v) BSA)、0.5%(w/v) SDS および 100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA 存在下、または 100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA を含む DIG EASY Hyb 溶液 (ベーリンガー・マンハイム社) 中で、65℃で保温し、次いで 1×SSC (0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム) および 0.5%(w/v) SDS 存在下に、室温で 15 分間の保温を 2 回行い、さらに 0.1×SSC (0.015M NaCl、0.0015M クエン酸ナトリウム) および 0.5%(w/v) SDS 存在下に、68℃で 30 分間保温する条件等をあげることができる。

その PCR 法に用いられるプライマーとしては、例えば、約 20bp から約 40bp 程度の長さの塩基配列を、配列番号 24 で示される塩基配列の 5' 末端非翻訳領域から選択した塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび 3' 非翻訳領域から

5 選択した塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成する  
 とよい。具体的には、例えばフォワードプライマーとしては配列番号26で示  
 される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドがあげられ、リバースプライマー  
 としては配列番号27で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドがあげ  
 10 られる。また、フォワードプライマーとして配列番号24で示される塩基配列  
 の塩基番号41～68で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、より具体  
 的には配列番号30で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをあげる  
 こともでき、リバースプライマーとして配列番号24で示される塩基配列の塩  
 基番号1874～1900で表される塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌク  
 15 レオチド、より具体的には配列番号31で示される塩基配列からなるオリゴヌ  
 クレオチドをあげることもできる。PCRの条件としては、例えば、反応液50 $\mu$ l  
 中に、10 x Ex Taq 緩衝液（宝酒造社製）5 $\mu$ l、2.5mM dNTP 混合液（各 2.5mM  
 の dATP, dGTP, dCTP, dTTP を含む。）4 $\mu$ l（dATP, dGTP, dCTP, および dTTP 各々  
 の終濃度が 0.2mM）、20  $\mu$ M プライマー 各 0.25～1.25 $\mu$ l（終濃度が 0.1～0.5  $\mu$ M）、  
 20 鋳型 cDNA 0.1～0.5  $\mu$ g、Ex Taq polymerase（宝酒造社製）1.25 ユニットを含む組  
 成の反応液にて、94℃で1分間次いで55℃で2分間更に72℃で2.5分間の保温  
 を1サイクルとしてこれを全30サイクル行う等の条件が挙げられる。

このようにして得られた本発明遺伝子は、例えば、J. S a m b r o o k,  
 E. F. F r i s c h, T. M a n i a t i s 著；モレキュラー クローニン  
 20 グ第2版（M o l e c u l a r C l o n i n g 2 n d e d i t i o n）、  
 コールドスプリング ハーバーラボラトリー（C o l d S p r i n g H a  
 r b o r L a b o r a t o r y）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的  
 方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、  
 TAクローニングキット（I n v i t r o g e n 社）や p B l u e s c r i p

t I I (Stratagene 社) などの市販のプラスミドベクターを用いて  
クローニングすることができる。

尚、本発明遺伝子は、配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 24 で示され  
る塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkap  
5 iller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等  
の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもでき  
る。

得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert 法 (例  
えば、Maxam, A. M & W. Gilbert, Proc. Natl.  
10 Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977 等に記載される) や Sa  
nger 法 (例えば Sanger, F. & A. R. Coulson, J. M  
ol. Biol., 94, 441, 1975、Sanger, F. & Nick  
len and A. R. Coulson., Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA, 74, 5463, 1977 等に記載される) 等により確認す  
15 ることができる。

本発明遺伝子を、該遺伝子が導入される宿主細胞において利用可能なベク  
ター (以下、基本ベクターと記す。)、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情  
報を含み、自立的に増殖できるものであつて、宿主細胞からの単離、精製が可  
能であり、検出可能なマーカーをもつベクターに、通常遺伝子工学的手法に  
20 準じて組み込むことにより本発明ベクターを構築することができる。

本発明ベクターの構築に用いることができる基本ベクターとしては、具体  
的には微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えばプラスミド pUC119 (宝  
酒造社製) や、ファージミド pBluescript II (Stratagene 社製) 等を用いることが  
できる。出芽酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミド pGBT9、pGAD424、

pACT2(Clontech 社製)などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は pRc/RSV、pRc/CMV(Invitrogen 社製)等のプラスミド、ウシパピローマウイルスプラスミド pBPV(アマシャムファルマシアバイオテク社製)もしくは EB ウイルスプラスミド pCEP4(Invitrogen 社製)等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞を宿主細胞とする場合には、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。

自律複製起点を含むベクター、例えば、上記の酵母用プラスミド pACT2 や、ウシパピローマウイルスプラスミド pBPV、EB ウイルスプラスミド pCEP4 などを用いて本発明ベクターを構築すると、該ベクターは宿主細胞に導入された際にエピソードとして細胞内に保持される。

バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組み込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いることができる。このようなトランスファーベクターの具体的例としては、Pharmingen 社から市販されている pVL1392, pVL1393(Smith, G. E., Summers M. D. et al. :Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165(1983))、pSFB5(Funahashi, S. et al. :J. Virol., 65, 5584-5588(1991))などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、該トランスファーベクターとウイルスのゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイルスのゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上にくみこまれたウイルスを得ることができる。ウイルスのゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vacciniavirus などのゲノムを用いることができる。

より具体的には、例えばバキュロウイルスに本発明遺伝子を組み込む場合、  
トランスファーベクターpVL1393, pVL1392 等のマルチクローニング部位に本発  
明遺伝子を挿入した後、該トランスファーベクターの DNA と Baculovirus genome  
DNA (Baculogold; Pharmingen 社製) とを昆虫細胞 Sf21 株 (ATCC から入手可能)

- 5 にリン酸カルシウム法等により導入し、得られた細胞を培養する。培養液から  
遠心分離等により、本発明遺伝子が挿入されたウイルスのゲノムを含有するウ  
イルス粒子を回収し、これをフェノール等で除蛋白処理することにより、本発  
明遺伝子を含有するウイルスのゲノムを得ることができる。さらに、該ウイル  
スのゲノムを、昆虫細胞 Sf21 株などのウイルス粒子形成能を有する宿主細胞に  
10 リン酸カルシウム法等により導入し、得られる細胞を培養することにより、本  
発明遺伝子を含有するウイルス粒子を増やすことができる。

一方、マウス白血病レトロウイルスなどの比較的小さなゲノムへは、トラ  
ンスファーベクターを利用せずに、本発明遺伝子を直接組み込むこともできる。

- 例 え ば ウ イ ル ス ベ ク タ -DC(X) ( Eli Gilboa et  
15 al., BioTechniques, 4, 504-512(1986)) などは、該ベクター上のクローニング部  
位に本発明遺伝子を組み込む。得られた本発明遺伝子の組込れたウイルスベク  
ターを、例えば Ampli-GPE (J. Virology, 66, 3755(1992)) などのパッケージング細  
胞に導入することにより、本発明遺伝子の挿入されたウイルスのゲノムを含有  
するウイルス粒子を得ることができる。

- 20 本発明遺伝子上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な  
形で結合させ、これを上述のような基本ベクターに組み込むことにより、本発  
明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクターを構築すること  
ができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入さ  
れる宿主細胞において、プロモーターの制御下に本発明遺伝子が発現されるよ

うに、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。宿主細胞で機能可能なプロモーターとしては、導入される宿主細胞内でプロモーター活性を示すDNAをあげることができる。例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター (lacP)、トリプトファンオペロンのプロモーター (trpP)、アルギニンオペロンのプロモーター (argP)、ガラクトースオペロンのプロモーター (galP)、tac プロモーター、T7 プロモーター、T3 プロモーター、 $\lambda$ ファージのプロモーター ( $\lambda$ -pL、 $\lambda$ -pR) 等をあげることができ、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合には、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期または後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合には ADH1 プロモーターなどをあげることができる。

また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有する基本ベクターを使用する場合には、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミド pRc/RSV、pRc/CMV 等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入することにより、本発明遺伝子を発現させることができる。これらのプラスミドにはあらかじめ SV40 の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori を欠失した SV40 ゲノムで形質転換された培養細胞、例えば COS 細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また前述の酵母用プラスミド pACT2 は ADH1 プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体

の ADH1 プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えば CG1945 (Clontech 社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

5 構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法としては、宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrook ら、コールド・スプリング・ハーバー、1989 年) 等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等の通常の方法を用いることができる。また、哺乳類動物細胞、魚類動物細胞または昆虫類動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法に準じて前記細胞に導入することができる。酵母を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法を基にした Yeast transformation kit (Clontech 社製) などを用いて導入することができる。 尚、ウイルスをベクターに用いる場合には、上述のように一般的な遺伝子導入法によりウイルスのゲノムを宿主細胞に導入できるほか、本発明遺伝子の挿入されたウイルスのゲノムを含有するウイルス粒子を、宿主細胞へ感染させることによっても、該ウイルスのゲノムを宿主細胞に導入することができる。

20 本発明形質転換体を選抜するには、例えば、本発明ベクターと同時にマーカー遺伝子を宿主細胞へ導入し、マーカー遺伝子の性質に応じた方法で細胞を培養すればよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターが導入された宿主細胞を培養すれば良い。薬剤耐

性付与遺伝子と選抜薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせなどをあげることができる。また、マーカー遺伝子が宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターが導入された細胞を培養すればよい。また、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクターを導入した場合には、エストロゲン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。

- 10        本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターとマーカー遺伝子を有するベクターとを制限酵素等で消化することにより直鎖状にした後、これらを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入されたマーカー遺伝子の発現を指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。また、例えば、上記の
- 15        ような選抜薬剤に対する耐性付与遺伝子をマーカー遺伝子として有する本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、該細胞を選抜薬剤が添加された培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選抜薬剤耐性クローンを純化培養することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を選抜することもできる。該形質転換体は、凍結
- 20        保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、実験毎の形質転換体作製の手間を省くことができ、また、あらかじめ性質や取扱い条件の確認された形質転換体を用いて試験を実施することが可能となる。

上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することによりエストロゲンレセプターを産生させることができる。



例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養することができる。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（巡回式振とう培養、往復式振とう培養、ジャーファーマンター（JarFermenter）培養、タンク培養等）などが可能である。培養温度および培地の pH は、微生物が生育する範囲から適宜選ぶことができ、例えば、約 15℃～約 40℃の培養温度にて、約 6.0～約 8.0 の培地 pH で培養するのが一般的である。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約 1 日間～約 5 日間である。温度シフト型や IPTG 誘導型等の誘導型のプロモーターを有する発現ベクターを用いた場合には誘導時間は 1 日以内が望ましく、通常数時間である。

また、上記形質転換体が哺乳類、魚類、昆虫類等の動物細胞である場合、該形質転換体は一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養することができる。選抜薬剤を利用して当該形質転換体を作製した場合は、該選抜薬剤の存在下に培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば終濃度が 10%となるよう FBS を添加した DMEM 培地（ニッスイ社製等）を用いて 37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件で数日ごとに新しい培養液に交換しながら培養すればよい。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、例えば 0.25%(w/v) 程度となるようトリプシンが添加された PBS 溶液を加えて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しいシャーレに播種し培養を続ける。昆虫類動物細胞の場合も同様に、例えば Grace's medium +10%(v/v)FBS+2%(w/v)Yeastlate 等の昆虫細胞用培養液を用いて培養温度 25℃から 35℃で培養すればよい。この際、Sf21 細胞などのシャーレからはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液を用いずピペッティングにより分散させ継代培養を行なうことができる。また、バキュロ

ウイルス等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、培養時間は細胞質効果が現れて細胞が死滅する前、例えばウイルス感染後 72 時間までとするのが好ましい。

- 本発明形質転換体により産生されたエストロゲンレセプターの回収は、適
- 5 宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせれば良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、集められた該細胞を通常のバッファー、例えば 20mM HEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF からなるバッファーに懸濁した後、ポリトロン、超音波処理、ダウンスホモジナイザー等で破碎し、破碎液を数万 xg で数十分間から 1 時間程度超遠心分離し、上清画分を回収すること
- 10 により、エストロゲンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロゲンレセプターを回収することもできる。この際、エストロゲン応答配列すなわちエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む約 15bp から約 200bp 程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとした DNA 結合アッセイなどにより、本発明のエストロ
- 15 ゲンレセプターを含む画分を見分けることもできる。

このようにして製造された本発明のエストロゲンレセプターは、例えば、被験物のエストロゲンレセプターに対する結合能・結合量を評価するためのレセプターバインディングアッセイ等に用いることができる。

- 20 本発明遺伝子は、例えば、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、アンタゴニスト活性等があげられる。

本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにおいて使用される「エストロ



ゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子」とは、  
具体的には、例えばエストロゲン応答配列を含むアフリカツメガエルのビテロ  
ジェニン遺伝子の転写制御領域等の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメ  
5 レポーター遺伝子を連結させたキメラ遺伝子などであり、宿主細胞内でのエス  
トロゲンレセプターの転写調節能をモニターするために用いることができる。  
このようなキメラ遺伝子作製に用いられるレポーター遺伝子としては、ルシフ  
フェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、 $\beta$ ガラクトシダー  
ゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホ  
10 ルモン遺伝子などを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高  
いレポーター蛋白質をコードする遺伝子が好ましい。

まず、本発明遺伝子と、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流  
に連結されたレポーター遺伝子とを、例えばエストロゲンレセプター非内在性  
宿主細胞、具体的には例えば HeLa 細胞、CV-1 細胞、Hepal 細胞、NIH3T3 細胞、  
15 HepG2 細胞、COS1 細胞、BF-2 細胞、CHH-1 細胞等に導入し形質転換体を作製す  
る。ここで、本発明遺伝子は、例えば上述のように、宿主細胞で機能可能なプ  
ロモーターと機能可能な形で結合され基本ベクターに組み込まれた形で宿主細  
胞へ導入するとよい。エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結  
されたレポーター遺伝子も、基本ベクターに組み込んで用いるとよい。また例  
20 えば、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポータ  
ー遺伝子が組み込まれたベクターと、宿主細胞で機能可能なプロモーターと機  
能可能な形で結合された本発明遺伝子を保有するベクターとを、マーカー遺伝  
子を有するベクターとともに宿主細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標  
にして選抜することにより、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流

に連結されたレポーター遺伝子、および宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で結合された本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得することができる。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、これをいったん取得すると、

- 5 アッセイのたびにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要がなく、また、形質転換体の性能も一定に保つことができることから、例えば自動化されたロボットによる大規模スクリーニングを実施する際にも有用である。

- 10 上述のように作製された形質転換体を、例えば 1 日間から数日間培養する間に、被験物を培地中に加えて前記形質転換体と接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが被験物中のエストロゲン様活性物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子の転写が促進され、レポーター遺伝子にコードされた蛋白質が形質転換体の細胞内などに蓄積されるかもしくは培地中に分
- 15 泌される。この蛋白質の量を測定することにより、該形質転換体の細胞あたりのレポーター遺伝子の発現量を測定する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合は、細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測
- 20 定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量を知ることができる。同様にして、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下におけるレポーター遺伝子発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプ

ターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体に  $17\beta$ -エストラジオール（以下、E2 と記す。）等のエストロゲンを接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定する。形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアンタゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性化能を有すると評価することができる。

- 10        また、本発明遺伝子または本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAを、細胞内のレポーター遺伝子の発現量を指標として、2種の融合蛋白質（two-hybrid）の複合体形成能および形成された複合体の転写調節能を検出することのできる試験系（ツーハイブリッドシステム；Nishikawa et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 154, 76-83(1999)）に利用することができる。具体的には例
- 15        えば、本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共役因子とが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムにおいて、被験物の添加によるレポーター遺伝子の発現量の増減を測定することにより、被験物のエストロ
- 20        ゲンレセプター活性調節能を評価することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、アンタゴニスト活性等があげられる。

かかるツーハイブリッドシステムとしては、例えば、下記の（A）～（C）記載の遺伝子の各一が同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体をあげるこ

とができる。

(A) 宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されており、宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の DNA 結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩

5 基配列からなるキメラ遺伝子。

(B) 宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されており、宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝

10 子。

(C) (A) 記載の DNA 結合領域が結合可能な塩基配列および (B) 記載の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。 宿主細胞としては、例えば、出芽酵母細胞や、HeLa 細胞などの哺乳類動物細胞等があげられる。本発明のエストロゲンレセプターに対する

15 被験物の活性調節能を精度よく測定するためには、エストロゲンレセプター非内在性の細胞を使用することが好ましい。

上記 (A) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域」としては、例えば、宿主細胞として出芽酵母細胞を使用する場合には、酵母由来の転写調節因子 GAL4 の DNA 結合領域、バクテリア由来のリプレッサー LexA 等をあ

20 げることができる。これらをコードする DNA と、本発明遺伝子の DNA もしくは本発明遺伝子の部分塩基配列であってエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列を有する DNA とを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、(A) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の DNA 結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガ

ド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」が得られる。前記の「本発明遺伝子の部分塩基配列であってエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列を有する DNA」としては、例えば、本発明遺伝子の塩基配列のうちエストロゲンレセプターのリガンド結合領域を  
5 コードする塩基配列を含み DNA 結合領域をコードする塩基配列を含まない塩基配列からなる DNA 等をあげることができる。具体的には例えば、配列番号 24 で示される塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 873～1689 で表される塩基配列を含み、塩基番号 1～762 で表される塩基配列を含まない塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号 24 で示される塩基配列の塩基番号 763  
10 ～1767 で表される塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

また、(B) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域」としては、例えば、GAL4 の転写活性化領域、大腸菌由来の B42 酸性転写活性化領域等があげられる。「本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子」とは、本発明のエストロゲンレセプターとリガン  
15 ドとの複合体を認識してこれに結合可能な転写共役因子であって、具体的には SRC1/NCoA1 (Onate, S. A. ら、Science, 1995, 270, 1354)、TIF2/GRIP1 (Voegel, J. J. ら、EMBO, J., 1996, 15, 3667) などがあげられる。前記のような転写活性化領域をコードする DNA と、前記転写共役因子もしくは該因子のレセプター結合領域をコードする DNA とを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、

20 (B) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」を得ることができる。尚、(A) および (B) 記載のキメラ遺伝子の構成を互いに入れ替えて、「宿主細胞内で機能可能な転写調節因

子の DNA 結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」および「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」の組合せとしてもよい。これらのキメラ遺伝子は、それぞれ「宿主細胞内で機能可能なプロモーター」の下流に接続されており、このようなプロモーターとしては、例えば、宿主細胞が出芽酵母細胞である場合には、GAL1 プロモーターのような誘導型プロモーターや、ADH プロモーターのような恒常的に発現するプロモーター等を使用することができる。

(C) 記載のレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、 $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高いレポーター蛋白質をコードする遺伝子が好ましい。該レポーター遺伝子は、上記 DNA 結合領域が結合可能な塩基配列および上記転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に接続される。例えば、GAL4 の DNA 結合領域が結合可能な塩基配列としては、GAL1 プロモーターの GAL4 結合領域をあげることができ、LexA が結合可能な塩基配列としては、LexA 結合領域があげられる。また、GAL4 の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターとしては、例えば、酵母由来の最小 TATAbox 配列があげられる。

上述のようなキメラ遺伝子およびレポーター遺伝子を、例えばそれぞれベクターに挿入し、それらを同一の宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。尚、宿主細胞が、利用可能な内在性のレポーター遺伝子を有する場合はそれを



利用しても良く、この場合はレポーター遺伝子の導入を省略することができる。  
 また、ツーハイブリッドシステムを調製するための市販のキット、例えば  
 Matchmaker Two-hybrid System (Clontech 社製)、CheckMate Mammalian  
 Two-Hybrid System (Promega) 等を利用して形質転換体を調製することもでき  
 5 る。本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターもしくは該レセプター  
 のリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共  
 役因子とがリガンド依存的に複合体を形成することにより、レポーター遺伝子  
 の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムの構成の一例としては、例え  
 ば、下記の (D) および (E) 記載の遺伝子が、内在性の GAL1 UAS (upstream  
 10 activating sequence) および酵母由来の最小 TATA box 配列の下流に接続されて  
 なる LacZ 遺伝子 (レポーター遺伝子) を有する出芽酵母 Y190 株 (Clontech 社製)  
 に導入された形質転換体をあげることができる。

(D) ADH1 プロモーターの下流に接続されており、GAL4 の DNA 結合領域と、  
 本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との  
 15 融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子。

(E) ADH1 プロモーターの下流に接続されており、GAL4 の転写活性化領域  
 と本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因  
 子 TIF2 または TIF2 のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配  
 列からなるキメラ遺伝子。

20 上述のように作製された形質転換体を、例えば数時間から数日間培養する  
 間に、被験物を培地中に加えて前記形質転換体と接触させ、エストロゲンレセ  
 プターもしくは該レセプターのリガンド結合領域と、転写共役因子もしくは該  
 因子のレセプター結合領域との複合体形成を惹起させ、その複合体の転写調節  
 能を前記レポーター遺伝子の発現量を指標にして測定する。具体的には、例え

ば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、被験物を接触させた形質転換体から調製された細胞粗抽出物に、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞粗抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量を知ることができる。同様にして、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下における発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体に E2 等のエストロゲンを接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定する。形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアンタゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性化能を有すると評価することができる。

本発明のエストロゲンレセプターを用いたレセプターバインディングアッセイは、該エストロゲンレセプターに対する化学物質の結合能の測定や結合量の定量のほか結合特異性、結合力の分析などが可能な試験方法である。例えば、上述のようにして本発明形質転換体から回収された本発明のエストロゲンレセプターに、標識されたりガンド（以下、標識リガンドと記す。）が結合しているところへ、被験物を共存させると、被験物と標識リガンドとの競合から、両者のレセプターへの親和性に応じて、標識リガンドがレセプターから遊離し、レ

セプターに結合した標識リガンドの量が減少し、よってレセプターに結合した標識量が減少する。従って、遊離型の標識リガンドの標識量または結合型の標識リガンドの標識量をモニターすることにより、被験物のレセプターへの結合能が間接的にわかる。

- 5 標識リガンドとしては、例えば、トリチウム標識された E2 等を用いることができる。標識リガンドの結合型／遊離型の分離はヒドロキシアパタイト法やグリセロール密度勾配超遠心法などで行うことができる。反応系は大きく 3 群にわけられる。1 番目の系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ溶媒のみが添加される群であり、被験物の濃度がゼロの系に相当し、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する総結合量を示す。2 番目の系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、例えば、標識されていない E2 が、レセプターを十分飽和し標識リガンドが結合できなくなるだけの濃度（例えば 10  $\mu$ M）となるよう添加された系であり、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する非特異的な結合量と判断される。したがって、エストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量は、総結合量からこの非特異的結合量を引いた値となる。3 番目の系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、被験物が、例えば最終濃度 10  $\mu$ M（この濃度は目的により任意に変更する。）となるよう添加された系である。被験物がエストロゲンレセプターへの結合能を有する場合は、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、上記のようにして求めた被験物濃度がゼロの時のエストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量より小さくなる。このようにしてレセプターバインディングアッセイを行うことにより、本発明のエストロゲンレセプタ

一に対する被験物の結合能を調べることができ、被験物が複数の物質を含む場合にはその中にエストロゲンレセプターに親和性を示す物質が存在するかどうかを調べることもできる。さらに、本発明のエストロゲンレセプターに対する被験物の結合能をより詳細に評価するには、例えば前記の 3 番目の系における

5 被験物の添加濃度を変えて同様にアッセイを行い結合型の標識リガンドの標識量を測定する。該測定値に基づき、各アッセイにおける結合型と遊離型のリガンド量を算出して、例えばスキッチャード解析を行うことにより、被験物と本発明のエストロゲンレセプターとの結合親和性、結合特異性、結合容量等を評価することができる。

- 10 本発明のレポーターアッセイ、ツーハイブリッドシステムおよびレセプターバインディングアッセイは、化学物質の安全性評価や、環境中のエストロゲン様活性物質の検出等に利用することができる。

## 実施例

- 15 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

- なお、実施例 1～8 によりエストロゲンレセプター  $\alpha$  機能を有する蛋白質およびエストロゲンレセプター  $\alpha$  機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を説明する。実施例 9～22 によりエストロゲンレセプター  $\beta$  機能を有する蛋白質
- 20 およびエストロゲンレセプター  $\beta$  機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を説明する。

## 実施例 1 (本発明遺伝子の取得)

### (1) 本発明遺伝子の取得用プローブの作製

ブルーギルの肝臓約100mgから、Trizol試薬 (Life Technologies社製) を用いて添付マニュアルに従い全RNAを抽出した。この全RNAの約1  $\mu$ gとThermoScript RT-PCR system (Life Technologies社製) を用いてcDNAライブラリーを作製した。

次に配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号9で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、上記のように調製されたcDNAを鋳型としてPCR (94 $^{\circ}$ C 1分間次いで55 $^{\circ}$ C 1分間さらに74 $^{\circ}$ C 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行った。増幅された約1 kbpのDNAを、pBluescript IISK (+) ベクター (Stratagene社製) のEcoRV部位を用いて作製したTAクローニングベクターにサブクローニングし、ベクターに挿入されたDNAの塩基配列を解析した。その結果から、配列番号3で示される塩基配列を有するDNAを取得した。該DNAが挿入されたベクターのDNA約2  $\mu$ gを制限酵素EcoRIおよびSalIで消化し、1%アガロースゲル電気泳動に供して分離した後、約1 kbのDNAをゲルから回収した。得られたDNAに、AlkPhos Direct system (アマシヤムファルマシアバイオテック社製) を用いて耐熱性アルカリフォスファターゼを直接標識することにより、プローブを調製した。

## (2) cDNAライブラリーの作製

ブルーギル肝臓組織より、フェノールクロロホルム-イソアミルアルコール法 (Plant Cell Physiol. 36 (1): pp85-93

(1995)) に準じて全RNAを調製した。全RNAの収量は約2.8mgであった。全RNA約500  $\mu$ gより、Oligotex (dT)<sub>30</sub>-Super (宝酒造社製) を用いて、poly (A)<sup>+</sup>RNAを調製した。poly (A)<sup>+</sup> RNAの収量は約10  $\mu$ gであった。次にGubler and Hoffman 5 法に基づいて cDNAライブラリーを作製した。まず2.4  $\mu$ gのpoly (A)<sup>+</sup>RNA、Oligo (dT)<sub>18</sub>-リンカープライマー ((GA)<sub>10</sub>ACGCGTCGACTCGAGCGGCCGCGGACCG (T)<sub>18</sub>、XhoI 認識配列を含む。)、RAV-2 RTase (宝酒造製) およびSuperScript II RTase (Gibco-BRL社製) を用い、5-methyl dCTPを添加して1本鎖cDNAを合成した。得られた1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成した後、その末端を平滑化し、EcoRI-N 10 otI-BamHIアダプター (宝酒造社製 code 4510) をライゲーションした。該DNAを制限酵素XhoIで消化して、スピンカラムに供して低分子量DNAを除去した後、EcoRIおよびXhoIで消化した  $\lambda$  ZAPIIとライゲーションを行った。得られたDNAとin vitro packaging kit (Stratagene社製) を用いて、in vitro packagingを行い、cDNAライブラリーを得た。該ライブラリーについて、宿主に大腸菌XL1 Blue MRF' 株 (Stratagene社製) を用いてタイトレーションを行ったところ、青色コロニーと白 20 色コロニーの出現率からインサート含有率は約95%と推定された。

### (3) 本発明遺伝子bger $\alpha$ の取得

実施例1 (2) で調製されたcDNAライブラリーを大腸菌XL1 Blue MRF' 株に導入し、直径150mmのLBプレート (1% Bact

o-Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) に約50,000クローンずつプレーティングしてプラークを形成させた。このプレートを集計6枚準備して、合計300,000クローンを以下のスクリーニングに供した。各プレートから、Hybond N+メンブレン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）にファージDNAをうつしとり、該メンブレンを変性液（1.5M NaCl, 0.5N NaOH）に5分間、次いで中和液（1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.2), 1mM EDTA）に10分間浸した後、乾燥させた。このメンブレンを80℃で2時間保温した後、上記のプロブを用いて、

Alk Phos Direct systemのプロトコールにしたがってハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。すなわち、前記メンブレンを0.5M NaClを含むハイブリダイゼーション溶液（アマシャムファルマシアバイオテク社製、5ngプロブ/ml）に浸し、55℃、16時間保温した。次いで、メンブレンを、一次洗浄バッファー（2M尿素、0.1% SDS、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>および0.2%ブロッキング試薬を含む50mM ナトリウムリン酸緩衝液、pH 7.0）中にて60℃、10分間保温した後、再度、一次洗浄バッファー中にて65℃、10分間保温した。さらに、二次洗浄バッファー（100mM NaClおよび2mM MgCl<sub>2</sub>を含む50mMナトリウムリン酸緩衝液）中にて室温、5分間の洗浄を2回行った。洗浄後のメンブレンについて、Alk Phos Direct systemに含まれるCDP-Starを基質として、アルカリフォスファターゼ酵素による化学発光システムにより、シグナルの検出を行った。フィルムにはHyperfilm ECL（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いた。シグナルの強いものから順に10個の陽性クローンを選択し、それ

5 ぞれ滅菌済チップを用いて採取し、SMバッファー（50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.01%ゼラチン）に懸濁して、4℃にて保存した。該陽性クローンをそれぞれ培養して直径約90 mmのLBプレートに1,000～1,500クローンずつプレーティングして（合計10プレート）プラークを形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング作業を行った。その結果、前記の10陽性クローンのうち、3クローンについて陽性のシグナルが得られたため該陽性クローンを採取した。次いで、これら3陽性クローンを培養して直径約
 10 90 mmのLBプレートに約200クローンずつプレーティングしてプラーク形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング作業を行った。このスクリーニングでも陽性のシグナルが得られたクローンを単一クローンとして単離した。該陽性クローンの保有するベクターから、λZAPIIベクターキット（ストラタジーン社製）添付のプロトコールに従って*in vivo excision system*を用いることにより、該ベクター
 15 に挿入されたDNAがpBluescript SK(−)のEcoRI部位とXhoI部位との間にクローニングされたプラスミドを得た。該プラスミドにクローニングされたDNAについて、Primer Walking法により、塩基配列の解析を行った。その結果、該DNAは配列番号2で示される塩基配列を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードしていることが判
 20 明した（以下、該アミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをBGER $\alpha$ と記し、当該レセプターをコードする遺伝子を本発明遺伝子**bger $\alpha$** と記す。また、前記プラスミドをpBSBGER $\alpha$ と名付けた。）。プラスミドpBSBGER $\alpha$ が導入された大腸菌DH5 $\alpha$ 株（*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pBSBGER $\alpha$ ）は、



独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センター (IPOD) 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6に、1999年09月20日に受託番号 FERM BP-6876 として寄託されている。

5 (4) 本発明遺伝子  $bger\alpha 2$  の取得

ブルーギルの肝臓約100mgから、Trizol試薬 (Life Technologies社製) を用いて添付マニュアルに従い全RNAを抽出した。得られた全RNAの約1 $\mu$ gとThermoScript RT-PCR system (Life Technologies社製) を用いてcDNAライブラリーを作製した。一方、配列番号10で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号11で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして、LA-Taq (宝酒造製) を用いてPCR (94℃ 1分間次いで60℃ 1分間さらに74℃ 0.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行いDNAを増幅した。増幅されたDNAは、3% NuSieve 3:1アガロースゲル (FMCバイオプロダクツ社製) を用いて電気泳動した。その結果、長さの異なる2種のDNAが検出された。それぞれのDNAをゲルから回収しダイレクトシーケンスに供した。長い方のDNAは、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有しており、一方、短い方のDNAは、該部分塩基配列から配列番号12で示される塩基配列が欠失した塩基配列を有していた。そこで、上記のブルーギル肝臓由来のcDNAを鋳型として、配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーとして、LA-Taq (宝酒造製) を用いてPCR (94℃ 1分間次いで55℃ 1分間さらに74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行った。増幅された約2.0 kbpのDNAをTAクローニングベクター (pGEM-T、プロメガ

社製) を用いて当該製品マニュアルに準じてクローニングを行い、得られた複数個のクローンの保有するベクターDNAの塩基配列を確認した。その結果、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424～1941で表される塩基配列を有するDNA、および配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を有するDNAが得られた。配列番号5で示される塩基配列の配列番号74～1819で表される塩基配列は、配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードしていることが判明した(以下、該アミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをBGER $\alpha$ 2と記し、当該レセプターをコードする遺伝子を本発明遺伝子bger $\alpha$ 2と記す。)

10

実施例2(本発明遺伝子bger $\alpha$ を含有する動物細胞発現用の本発明ベクターの構築)

RSVプロモーターを有する発現プラスミドpRc/RSV(Invitrogen社)2 $\mu$ gを、制限酵素Xba I(10U)で、37℃にて終夜消化し、さらにアルカリフォスファターゼ(BAP)5Uを65℃にて1時間反応させた。これをアガロース(アガロースS;ニッポンジーン社製)ゲルを用いた電気泳動に供し、5～6kbpの長さを示すバンド部分からジーンクリーン(フナコシ社製)を用いてDNAを回収し、ベクターDNAとした。一方、実施例1(3)で取得されたプラスミドpBSBGER $\alpha$ のDNAを鋳型として、配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと、LA-Taq(宝酒造製)を用いてPCR(94℃ 1分間次いで55℃ 2分間さらに74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル)を行いDNAを増幅した。増幅されたDNAをクロロホルム/フェノール処理の後、エタノール

沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させ、TEを加えて溶解させた後、制限酵素XbaIで37℃で5時間消化した。次いで、該消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1.5kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて精製した。その約100ngを上記のように調製したベクターDNA 50ngと混合し、5UのT4 ligaseを添加して16℃にて3時間保温した。この反応液を大腸菌 DH5  $\alpha$  株コンピテントセル（TOYOBO社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドDNAの塩基配列を解析し、RSVプロモーターの下流に連結された本発明遺伝子 bger $\alpha$ を有するプラスミドをpRc/RSV-BGER $\alpha$ と名付けた。

実施例3（本発明遺伝子 bger $\alpha$ 2を含有する動物細胞発現用の本発明ベクターの構築）

15 実施例2で作製されたBGER $\alpha$ 発現プラスミドpRc/RSV-BGER $\alpha$ のうち2  $\mu$ gを、制限酵素HindIII（10U）で、37℃にて終夜消化し、さらにアルカリフォスファターゼ（BAP）5Uを65℃ 1時間反応させた。これをアガロース（アガロースS；ニッポンジーン社製）を用いたゲル電気泳動に供し、5～6kbpの長さを示すバンド部分からジーンクリーン（フナコシ社製）を用いてDNAを回収しベクターDNAとした。一方、実施例1（4）で調製されたcDNAを鋳型として、配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてLA-Taq（宝酒造製）にてPCR（94℃1分間次いで55℃2分間さらに74℃2.5分間の保温を1サイクルと

してこれを30サイクル)を行い本発明遺伝子のDNAを増幅した。これをクロロホルム／フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させ、TEを加えて溶解させた後、制限酵素HindIIIで37℃で終夜消化した。次いで、該消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1.0kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン(フナコシ社製)を用いて精製した。その約100ngを上記のように調製したベクターDNA 50ngと混合し、5UのT4 ligaseを添加して16℃にて3時間保温した。この反応液を大腸菌 DH5 $\alpha$ 株コンピテントセル(TOYOBO社製)に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドDNAの塩基配列を解析し、RSVプロモーターの下流に、配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を含むプラスミドを選択して、これをpRc／RSV-BGER $\alpha$ 2と名付けた。

15

#### 実施例4(本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイ)

##### (1)レポーターアッセイ用のレポータープラスミドの作製

IsoGen試薬(ニッポンジーン社製)を用いて該試薬に添付のプロトコールに記載の方法で、アフリカツメガエルのゲノムDNAを精製した。該ゲノムDNAを鋳型として、Walkerらの報告(Nucleic acid Res. (1984) 12, 8611-8626)に準じてPCRを行なうことにより、アフリカツメガエルビテログニン遺伝子上流のTATA boxからエストロゲンレセプター応答配列までを含むDNAを増幅した。増幅されたDNAを回収し、その末端をBlunting kit(宝酒造社製)を用い

て平滑化した（該DNAを、以下、ERE DNAと記す。）。配列番号17  
 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号18で示され  
 る塩基配列からなるオリゴヌクレオチド [マウスメタロチオネインI遺伝子の  
 TATA box近傍の塩基配列とリーダー配列 (Genbank Accession No. J00605) に由来する] をアニーリングさせて2本鎖  
 5 DNAとし、これにT4ポリヌクレオチドカインースを作用させてその両末端  
 をリン酸化した（該DNAを、以下、TATA DNAと記す。）。一方、ホタル  
 ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3（プロメガ社製）を制限酵  
 素Bgl IIおよびHind IIIで消化した後、これにBacterial alkaline phosphatase (BAP) を加えて65℃  
 10 で1時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース (Agarose L; ニッポンジーン社製) を用いた電気泳動に供し、pGL3由来のルシフェラー  
 ゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに相当する泳動度  
 を示すDNAを回収した。該DNA約100ngと、前記のTATA DNA  
 15 1μgとを混合し、T4リガーゼで結合させることによりプラスミドpGL3  
 -TATAを作製した。次に、pGL3-TATAを制限酵素Sma Iで消  
 化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロ  
 ースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNA  
 約100ngと、上記 ERE DNA約1μgとを混合してT4リガーゼを  
 20 反応させた後、該反応液をDH5αコンピテントセル (TOYOBO社製) へ  
 導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保  
 有するプラスミドのDNAを調製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho  
 Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-  
 TATAのSma I部位にERE DNAが1コピー導入された構造を有す

るプラスミドを pGL3-TATA-ERE と名付け、また、前記部位に ERE DNA が 5 コピー導入された構造を有するプラスミドをプラスミド pGL3-TATA-ERE x 5 とした。

## 5 (2) 一過性発現系によるレポーターアッセイ

HeLa 細胞 約  $2 \times 10^6$  細胞を 10 cm プレートに播種し、チャコールデキストラン処理済み FBS (以下、FBS と記す。) が 10 v/v % となるよう添加された E-MEM 培地で、5 % CO<sub>2</sub> 条件下 37 °C にて 1 日間培養を行った。次いで、細胞に、Lipofectamine (Life Technologies 社製) を用いてそのプロトコールに従い、3.75  $\mu$ g の pRc/RSV-BGER  $\alpha$  または pRc/RSV-BGER  $\alpha$ 2 と、3.75  $\mu$ g の pGL3-TATA-ERE x 5 とを同時に導入した。37 °C にて 16 時間培養後、培地を交換しさらに 3 時間培養した。その後、細胞を集めて FBS が 10 v/v % となるよう添加された E-MEM 培地に懸濁して均一化し、予め DMSO で溶解した様々な濃度の E2 (和光純薬社製)、ジエチルスチルベステロール (DES) (ナカライテスク社製)、ビスフェノール A (和光純薬社製)、ゲニステイン (和光純薬社製) または o, p'-DDT (Lancaster 社製) を添加した 96 穴プレート (DMSO 終濃度 0.1 %) に播種した。また、抗エストロゲン作用を測定するために、同様に様々な濃度の 4-ヒドロキシタモキシフェンと 10 nM の E2 とを同時に添加した 96 穴プレート (DMSO 終濃度 0.1 %) に上記細胞を播種した。細胞が播種された 96 穴プレートは 37 °C にて約 40 時間培養した後、5 倍に希釈した細胞溶解剤 PGC50 (ニッポンジーン社製) を 50  $\mu$ l/well ずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて 30 分間放置して細胞を溶解させた。このように調製された細胞

溶解液を10  $\mu$ l ずつ96穴白色サンプルプレート（ベルトールド社製）に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB96p（ベルトールド社製）で50  $\mu$ l /well ずつ酵素基質液PGL100（ニッポンジーン社製）を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定した。pRc/RSV-BG

5 E R  $\alpha$  を導入した細胞を用いた結果を図1～6に示し、pRc/RSV-BG E R  $\alpha$ 2 を導入した細胞を用いた結果を図7～11に示す。上記のように、本発明遺伝子を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、被験物のエストロゲンレセプター活性化能または活性化阻害能を測定することができた。

さらに、他の被験物を同様に試験することにより、エストロゲンレセプター活

10 性化能を有する物質またはエストロゲンレセプター活性化阻害能を有する物質を検出することができる。

（3）本発明遺伝子が染色体に導入されたレポーターアッセイ用形質転換体の作製

15 プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社から購入）をBamHIで消化し、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製する。該DNAと、実施例4（1）記載のプラスミドpGL3-TATA-EREをBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌DH5 $\alpha$ コンピテントセル

20 ル（TOYOBO社製）に導入する。得られたアンピシリン耐性的大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素BamHIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析する。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミドpGL3-TATA-EREのBamHI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpG

L3-TATA-ERE-BSDとする。

次に、ヒト由来のHeLa細胞に、上記のように作製されたプラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、本発明遺伝子がpRc/RSVに組込まれた発現ベクターのDNAを、それぞれ直鎖化して実施例4  
5 (2) のようにして導入し、これらのDNAが宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得する。

まず、プラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、本発明遺伝子がpRc/RSVに組込まれた発現ベクターのDNAをそれぞれSal Iで消化する。

10 HeLa細胞は、10v/v% FBSを含むDMEM培地（日水製薬社製）を用いて37℃にて5% CO<sub>2</sub>存在下に、直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養する。約5 x 10<sup>5</sup>の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクチン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドのDNAを同時に導入する。リポフェクション法の条件はリポフェクチンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、  
15 直鎖化されたプラスミドDNAの総量7 μg（各々3.5 μg）/シャーレ、リポフェクチン量は20 μl /シャーレとする。リポフェクション後、10v/v% FBSを含むDMEM培地中でそのまま3日間培養する。次に、細胞をトリプシン処理でシャーレから剥がし、1/10量ずつ新しい10枚のシャー  
20 レに播種し、そのまま翌日まで培養する。次に、G418（SIGMA社製）を最終濃度400 μg/mlとなるように、および、ブラストサイジンSを最終濃度8 μg/mlとなるように培養液に添加し、培養を継続する。一週間後、G418およびブラストサイジンSを前記と同じ濃度含む新しい培地に交換し、更に培養を継続する。一週間後、同じ操作を再度行う。さらに一週間後、倒立



型顕微鏡でシャーレを観察し、出現した直径数mmのコロニーを30コロニー、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド製）にコロニーごと移し、さらに培養を続ける。細胞をコンフルエントになる前にトリプシン処理により剥がして回収し、3等分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種する。1枚はそのまま継代と培養を続け、残り2枚の内の一方には最終濃度50nMとなるようE2を加え、もう一方には未添加とし、それぞれを2日間培養する。2日後、それぞれの培養上清を除き、200 $\mu$ l/wellのPBS（-）で細胞を2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50（ニッポンジーン社製）を20 $\mu$ lずつ加えて、室温に30分間放置し細胞を溶解させる。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96p（ベルトールド社製）にそれぞれセットし、50 $\mu$ lの基質液PGL1000（ニッポンジーン社製）を自動分注しながら、ルシフェラーゼ活性を測定する。E2が添加された系の方が、E2が添加されていない系に比べ、2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す形質転換体を選抜する。

15

（4）本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いるレポーターアッセイ

実施例4（3）に記載のようにして作製されるHeLa細胞の形質転換体を24穴プレートに約 $4 \times 10^4$ 細胞/wellずつ播種し、チャコールデキストラン処理済みの10v/v%FBS、400 $\mu$ g/mlのG418および8 $\mu$ g/mlのブラストサイジンSを含むE-MEM培地（以下、FBSおよび抗生物質含有E-MEM培地と記す。）で、5%CO<sub>2</sub>条件下37℃にて1日培養を行う。被験物をDMSO（和光純薬社製）に溶解させ最終濃度が1nMから50 $\mu$ Mとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、前

記の被験物溶解液と同量のDMSOを添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、及びE2をDMSOに溶解させ最終濃度1  $\mu$ Mとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地を調製し、これを前記の細胞の培養上清と交換する。該細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養し、24時間後に

5 培養上清を除き、ウェルに接着している細胞を剥がさないように1 ml / ウェルのPBS (-) でウェルを2回洗浄し、5倍に希釈した細胞溶解剤PGC50 (ニッポンジーン社製) を50  $\mu$ l / well ずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させる。このように調製された細胞溶解液を10  $\mu$ l ずつ96穴白色サンプルプレート (ベルトールド社製) に

10 採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB96p (ベルトールド社製) で50  $\mu$ l / well ずつ酵素基質液PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定する。

このような本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、エストロゲンレセプター活性化能を有

15 する物質を含む被験物を見出すことができる。

#### 実施例5 (本発明遺伝子を利用したツーハイブリッドシステム)

(1) 本発明 BGER  $\alpha$  のリガンド結合領域と転写調節因子のDNA結合領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含有するベクターの作製

20 本発明遺伝子 b g e r  $\alpha$  を含有するプラスミド p B S B G E R  $\alpha$  を鋳型として、配列番号19で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号20で示される塩基配列からなるプライマーとLA-Taq (宝酒造社製) を用いて添付マニュアルに従いPCR (94 $^{\circ}$ C 1分間次いで55 $^{\circ}$ C 1分間さらに74 $^{\circ}$ C 1.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行い、

本発明 BGER  $\alpha$  のリガンド結合領域をコードする DNA を増幅した。増幅された DNA は、クロロホルム／フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70% エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。この DNA に TE を加えて溶解させた後、制限酵素 *EcoRI* と *SalI* とで 37℃ で約 5 時間消化した。消化

5 物を 1% アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約 1100 bp の DNA を含むゲル部分を切り出し、これに含まれる DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて添付マニュアルに従い回収した。一方、GAL4 蛋白の DNA 結合領域との融合蛋白質作製用ベクター pGBT9（Clontech 社製）（約 50 ng）を *EcoRI* および *SalI* で消化した後、アガロースゲル電

10 気泳動に供して、*EcoRI* および *SalI* で消化されたベクター DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて回収した。該ベクター DNA と前記回収 DNA 約 10 ng とを混合し、同容量のライゲーション液（宝酒造製ライゲーションキット）を加え、16℃ で約 1 時間保温し、次いでコンピテントセル DH5  $\alpha$ （TOYOBO 社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、ア

15 ンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミド DNA をアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、pGBT9-BGER  $\alpha$  LID と名付けた。

上記のプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーハイブリッドシステムに使用することができる。

20

（2）転写共役因子のレセプター結合領域と転写調節因子の転写活性化領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含有するベクターの作製

ヒト脳由来 mRNA（Clontech 社製）と RT-PCR キット（宝酒造製）を用いて製品添付のプロトコールに従い cDNA を作製した。作製さ

れた cDNA を鋳型として、L A - T a q (宝酒造社製) と配列番号 21 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号 22 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて P C R (94℃で1分間次いで55℃で1分間さらに72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行い、転写共役因子 T I F 2 のアミノ末端から624番目のアミノ酸から1287番目のアミノ酸までのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNAは、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。このDNAにT E を加えて溶解させた後、制限酵素 E c o R I と B g l I I とで37℃で5時間消化した。消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約2.0 k b p のDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて精製した。一方、G A L 4 蛋白の転写活性化領域とのキメラ蛋白作製用ベクター p G A D 4 2 4 (C l o n t e c h 社製) (約50 n g) を E c o R I および B a m H I で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して消化されたベクターDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて回収した。回収されたベクターDNAと前記精製DNA約10 n g とを混合し、同容量のライゲーション液 (宝酒造製ライゲーションキット) を加え、16℃で約1時間保温し、次いでコンピテントセル D H 5  $\alpha$  (T O Y O B O 社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入した。アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、p G A D 4 2 4 - T I F 2 R I D と名付けた。このプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーハイブリッドシステムに使用することができる。

### (3) 出芽酵母細胞を宿主細胞とするツーハイブリッドシステムの作製

酵母Y190 (Clontech社製) をMatchmaker Two-Hybrid System (Clontech社製) のマニュアルに従い YPD培地で終夜30℃で振盪培養した。該酵母を集菌後、その細胞内に、実施例5 (1) 記載のpGBT9-BGER  $\alpha$ LIDおよび実施例5 (2) 記載のpGAD424-TIF2RIDを、Yeastmaker yeast transformation system (Clontech社製) を用いて導入した。前記プラスミドの導入された酵母細胞は、トリプトファンおよびロイシンを含まないSDプレート上に播き、30℃で約2日間培養する。培養後、3コロニーを選択し再びトリプトファンおよびロイシンを含まないSDプレート上に塗布し、30℃で約2日間培養した。

### (4) 酵母ツーハイブリッドシステムを用いた被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の測定

実施例5 (3) で調製された酵母の一部をトリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地1mlに植菌し、30℃で終夜振盪培養し、得られた培養液をトリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地で約80倍に希釈した。96穴のディープウェルプレートの各ウェルに、DMSOに溶解した様々な濃度のE2 (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製)、1  $\mu$ Mのジェチルスチルベステロール (DES) (ナカライテスク社製)、1mMのビスフェノールA (和光純薬社製)、100  $\mu$ Mのp-ノニルフェノール (関東化学社製)、100  $\mu$ Mのゲニステイン (和光純薬社製)、100  $\mu$ Mのクメステロール (INDOFINE Chemical社製)、1mMのダイゼイン (シグマ社製)、1mMのメトキシクロル (和光純薬社製)、

または1 mMのo, p'-DDT (Lancaster社製) 2.5  $\mu$ lを加え (DMSO終濃度1%とする)、ここへ上記培養酵母希釈液を250  $\mu$ lを添加して、30℃で4時間振盪培養した。培養後、各ウェルから酵母液100  $\mu$ lを回収しこれに100  $\mu$ lの $\beta$ ガラクトシダーゼ活性測定用発光反応液 (Gal-Screen、Tropix社製) を加え、約1.5時間室温で保温した後、ルミノメーターLB96p (ベルトールド社製) で発光量を測定した。

図12にE2 (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製) の濃度依存的な活性誘導の結果を示す。また図13に終濃度10 nMのジェチルスチルベステロール (DES)、10  $\mu$ MのビスフェノールA、1  $\mu$ Mのp-ノニルフェノール、1  $\mu$ Mのゲニステイン、1  $\mu$ Mのクメステロール、10  $\mu$ Mのダイゼイン、10  $\mu$ Mのメトキシクロルおよび10  $\mu$ Mのo, p'-DDTの活性誘導結果を示す。

実施例6 (本発明遺伝子を含有する組換えウイルスベクター及び組換えウイルス粒子の作製)

本発明ベクターpRc/RSV-BGER $\alpha$ のDNA 2  $\mu$ gを10 Uの制限酵素XbaIで、pRc/RSV-BGER $\alpha$ 2のDNA 2  $\mu$ gを10 Uの制限酵素HindIIIで、それぞれ37℃にて1時間消化した後、それぞれ低融点アガロースゲル電気泳動に供し約1.5~1.7 kbpのDNA断片を回収する。pRc/RSV-BGER $\alpha$ 2由来のDNAはその約1  $\mu$ gを、DNA bluntingキット (宝酒造社製) で処理してその末端を平滑化し、これに次にT4ポリヌクレオチドカイネースを反応させてその末端をリン酸化する。該DNAをフェノール処理した後、エタノール沈殿法により精製し、その全量を下記の発現プラスミド作製用のインサートDNAとして用い

る。一方、 $2\text{ }\mu\text{g}$ のpVL1392ベクターDNAを10Uの制限酵素Xba IまたはSma Iで消化し、10Uのアルカリフォスファターゼで65℃にて1時間処理後、低融点アガロースゲル電気泳動に供しDNAを回収しそれぞれpVL1392-Xba Iおよび pVL1392-Sma Iとする。このp

5 VL1392-Xba IベクターDNA 100ngに、上記のようにpRc/RSV-BGER $\alpha$ から調製した約1.5 kbpのDNAを約100ng加え、5UのT4 Ligaseを用いて16℃にて3時間保温する。これをE. coli DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセル（TOYOBO社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミドDNAを

10 アルカリ法で調製する。それぞれのプラスミドDNA約1 $\mu\text{g}$ を10Uの制限酵素Xba Iで37℃にて1時間消化した後アガロースS（ニッポンジーン社製）を用いたアガロース電気泳動で分析し、約1.5 kbpのバンドが検出されるクローンを選択する。また、pVL1392-Sma IベクターDNA 100ngに、上記のようにpRc/RSV-BGER $\alpha$ 2から調製した約1.

15 7 kbpのDNAを約100ng加え、5UのT4 Ligaseを用いて16℃にて3時間保温する。これをE. coli DH5 $\alpha$ 株のコンピテントセル（TOYOBO社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製する。それぞれのプラスミドDNA約1 $\mu\text{g}$ を10Uの制限酵素Xba IおよびHindIIIで3

20 7℃にて1時間消化した後アガロースS（ニッポンジーン社製）を用いたアガロース電気泳動で分析し、約1.7 kbpのバンドが検出されるプラスミドを選択する。該プラスミドのDNAをアルカリ法にて調製し、組換えBaculovirus作製に用いるトランスファーベクターpVL1392-BGER $\alpha$ およびpVL1392-BGER $\alpha$ 2とする。

$1 \times 10^6$ 個のSf21細胞(ATCCから入手)を $75 \text{ cm}^2$ のT型フラスコ(ファルコン社製)中で10% FBSおよび2% Yeast tlateを含むGrace's medium(以下、FBS含有Grace培地と記す。)を用いて $27^\circ\text{C}$ にて一晚培養する。一方、上記のようにして作製されるトランスファクターpVL1392-BGER $\alpha$ またはpVL1392-BGER $\alpha$ 2のDNA $10 \mu\text{g}$ と、直鎖状に調製されたウイルスゲノムDNA Baculo gold(Pharmingen社製) $20 \text{ ng}$ とをGrace's medium  $100 \mu\text{l}$ に添加し、滅菌水で2倍に希釈したリポフェクチン(GIBCO社製) $10 \mu\text{l}$ を加え、室温にて30分間放置する。一晚培養された前記のSf21細胞の培養上清を除き、血清を含まないGrace's medium少量で細胞を洗った後、同培地 $5 \text{ ml}$ を細胞に添加し、これに前記のリポフェクチン-DNA混合液を全量加え、 $27^\circ\text{C}$ にて3時間保温する。次いで、FBS含有Grace培地で細胞を洗った後、FBS含有Grace培地 $20 \text{ ml}$ を細胞に添加し、5日間 $27^\circ\text{C}$ にて培養する。5日目に培養上清を回収して $50 \text{ ml}$ 容の遠心チューブに採り、 $5000 \times g$ で15分間遠心分離することにより細胞の破片を沈殿させ、遠心上清を回収する。この上清全量を $100,000 \times g$ で24時間超遠心分離し、ウイルス粒子をペレットとして得る。このペレットを $100 \mu\text{l}$ のTEに懸濁し、当量のTE飽和フェノールを加え、穏やかに室温にて24時間混合する。これを $10,000 \times g$ 、10分間遠心分離した後、水層を回収し、これに当量のクロロホルムを加え10分間穏やかに混合し、再度 $10,000 \times g$ 、10分間の遠心分離を行う。水層を回収し、該水層に終濃度 $0.2 \text{ M}$ となる量のNaClと2.5倍量のエタノールを加え、本発明遺伝子を保有するウイルスベクターのDNAを沈殿として回収する。



実施例 7 (本発明の組換えウイルスベクターが Sf 21 細胞へ導入された形質転換体の作製と本発明のエストロゲンレセプターの製造)

Sf 21 細胞 (ATCC から入手) を  $75 \text{ cm}^2$  の T 型フラスコ (ファルコン社製) に  $1 \times 10^6$  個ずつ計 10 枚播種し、 $27^\circ\text{C}$  にて FBS 含有 GRACE 培地で培養する。この細胞に、実施例 6 のように調製される組換えウイルス粒子を含む培養上清を  $10 \mu\text{l}$  / フラスコの割合で加え、そのまま 4 日間培養する。この培養上清を採取し、前記と同様に  $75 \text{ cm}^2$  の T 型フラスコ (ファルコン社製) 10 枚に培養した前 Sf 21 細胞へ、該培養上清をフラスコ一枚あたり  $1 \text{ ml}$  ずつ加え、60 時間培養する。60 時間後、細胞をピペッティングにより懸濁してフラスコより回収し、得られた細胞懸濁液を  $5,000 \times g$  で 15 分間遠心分離しペレットとする。この細胞のペレットを  $20 \text{ mM}$  HEPES pH 7,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $0.5 \text{ mM}$  PMSF バッファーに懸濁した後、得られる細胞懸濁液をダウンス型ガラスホモジナイザーで上下に 30 回ホモジナイズし細胞を破碎する。この破碎液を  $30,000 \times g$  で 1 時間超遠心分離して上清画分を回収することにより、本発明のエストロゲンレセプターを含む画分を得る。

実施例 8 (レセプターバインディングアッセイ)

結合反応バッファーは、最終組成が  $20 \text{ mM}$  HEPES-KOH pH 7.9,  $10 \text{ mM}$  モリブデン酸ナトリウム,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $0.5 \text{ mM}$  EDTA,  $0.5 \text{ mM}$  PMSF (いずれも和光純薬社製) となるように調製する。反応系は総容量を  $100 \mu\text{l}$  とし、本発明のエストロゲンレセプターを含む細胞抽出物を  $10 \mu\text{g}$  蛋白質添加し、トリチウム標識された E2 を  $1 \text{ pM}$  か

ら100 nM程度になるよう添加する。非特異的結合を調べるための試験区には標識されていないE2を最終濃度10 μMになるようにさらに加える。

結合反応は、以下のように行う。反応液を氷上で15時間保温した後、チャコールデキストラン液〔組成：10 mM Tris-HCl、0.2%の酸  
5 洗活性炭（ナカライテスク社製Norit A）、0.005%ファルマシアDextran T70〕を100 μl加え、10分間氷上に放置する。この反応液を低速遠心機で1,000 x gで10分間遠心分離して活性炭を沈殿させ、上清を100 μl分取し、その放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定する。この測定値を基に、該上清画分中の標識E2量、すなわち、レセプ  
10 ターに結合した標識E2量（結合型標識リガンド量）を求める。標識E2のみが添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する全結合量に相当する。一方、標識E2に加え標識されていないE2が添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する非特異的結合量に相当する。各種濃度の標識E2が添加された反応系それぞれについて、全結合量から非特異的結合量を差し引いて、その反応系における標識リガ  
15 ンドのレセプターに対する特異的結合量を求める。次いで、Y軸に（特異的結合標識リガンド濃度／遊離標識リガンド濃度）、X軸に特異的結合標識リガンド濃度をプロットし、スキッチャード解析することにより、本発明のエストロゲンレセプターのE2に対するKd値を求める。

20 エストロゲンレセプターに対する被験物の親和性を測定するには、上記と同様にして1 nM程度のトリチウム標識E2が入っているバインディングアッセイ結合反応液へ被験物を終濃度が1%程度となるよう添加する。なお被験物が添加されない系には、被験物と同量の溶媒を系に加える。被験物添加によりレセプターに対する標識E2の結合量が低下する場合は、その被験物にはエス

トロゲンレセプターに結合するような物質が含まれると判断される。

#### 実施例 9 (本発明遺伝子の取得)

ブルーギル肝臓組織より、フェノールクロロホルム-イソアミルアルコール法(Plant Cell Physiol. 36 (1):pp85-93(1995))に準じて全 RNA を調製した。全 RNA の収量は約 2.8mg であった。全 RNA 約 500  $\mu$ g より、Oligotex (dT)<sub>30</sub>-Super (宝酒造社製)を用いて、poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。poly(A)<sup>+</sup>RNA の収量は約 10  $\mu$ g であった。次に Gubler and Hoffman 法に基づいて cDNA ライブラリーを作製した。まず 2.4  $\mu$ g の poly(A)<sup>+</sup>RNA、Oligo(dT)<sub>18</sub>-リンカープライマー ((GA)<sub>10</sub>ACGCGTCGACTCGAGCGGCCGCGGACCG(T)<sub>18</sub>、XhoI 認識配列を含む。)、RAV-2 RTase (宝酒造製) および SuperScriptII RTase (Gibco-BRL 社製) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。1 本鎖 cDNA 合成時に 5-methyl dCTP を用いた。得られた 1 本鎖 DNA から 2 本鎖 DNA を合成した後、その末端を平滑化し、EcoRI-NotI-BamHI アダプター (宝酒造社製 code 4510)をライゲーションした。

15 該 DNA を制限酵素 XhoI で消化して、スピンカラムに供して低分子量 DNA を除去した後、EcoRI および XhoI で消化した  $\lambda$ ZAPII とライゲーションを行った。得られた DNA と in vitro packaging kit (Stratagene 社製)を用いて、in vitro packaging を行い、ライブラリーを得た。該ライブラリーについて、宿主に大腸菌 XL1 Blue MRF' 株 (Stratagene 社製) を用いてタイトレーションを行ったところ、青色コロニーと白色コロニーの出現率からインサート含有率は約 95%と推定された。

20

次に、配列番号 28 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 29 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、ブルーギルの肝臓から上記のよう

に調製された 2 本鎖 cDNA を鋳型として PCR (94°C 1 分間次いで 55°C 1 分間さらに 74°C 2.5 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行った。増幅された約 1kbp の DNA 断片を pBluescriptIISK(+)ベクター(Stratagene 社製)の EcoRV 部位を用いて作製された TA クローニングベクターにサブクローニングし、

5 得られたクローンの保有するベクターに挿入された DNA の塩基配列を解析した。その結果から、配列番号 25 で示される塩基配列を有する DNA を選択し、該 DNA を、これを保有するクローンから精製した。精製した DNA に、AlkPhos Direct system (アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて、耐熱性アルカリフォスファターゼを直接標識することによりプローブを調製した。一方、上記の

10 ようにして調製したライブラリーを大腸菌 XL1 Blue MRF' 株に導入し、直径 150mm の LB プレート (1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar) に約 50,000 クローンずつプレーティングしてブラックを形成させた。このプレートを合計 6 枚準備して、合計 300,000 クローンを以下のスクリーニングに供した。各プレートから、Hybond N +メンブレン(アマシャムファルマシアバイオ

15 テク社製)にファージ DNA をうつしとり、該メンブレンを変性液 (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) に 5 分間、次いで中和液 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH7.2), 1mM EDTA) に 10 分間浸した後、乾燥させた。このメンブレンを 80°C で 2 時間保温して DNA を固定した後、上記のプローブを用いて、AlkPhos Direct system のプロトコールにしたがってハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。すな

20 わち、前記メンブレンを 0.5M NaCl を含むハイブリダイゼーション溶液 (アマシャムファルマシアバイオテク社製、5ng プローブ/ml) に浸し、55°C、16 時間保温した。次いで、メンブレンを、一次洗浄バッファー (2M 尿素、0.1% SDS、150 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2% ブロッキング試薬を含む 50 mM ナトリウムリン酸緩衝液、pH7.0) 中にて 60°C、10 分間保温した後、再度、一次洗浄バッファー中

にて 65℃、10 分間保温した。さらに、二次洗浄バッファー (100 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>を含む 50 mM ナトリウムリン酸緩衝液) 中にて室温、5 分間の洗浄を 2 回行った。洗浄後のメンブレンについて、AlkPhos Direct system に含まれる CDP-Star を基質として、アルカリフォスファターゼ酵素による化学発光システムにより、シグナルの検出を行った。フィルムには Hyperfilm ECL (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いた。シグナルの強い陽性クローンを選択し、該陽性クローンは滅菌済チップを用いて採取し、SM バッファー (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.01%ゼラチン) 中、4℃にて保存した。得られた陽性クローンを培養して直径約 90mm の LB プレートに 1,000 ~1,500 クローンずつプレーティングして (合計 10 プレート) プラークを形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング作業を行った。その結果、1 クローンについて陽性のシグナルが得られたため該陽性クローンを採取した。該陽性クローンを、λZAPII ベクターキット (ストラタジーン社製) 添付のプロトコールにしたがい、in vivo excision system を用いて、pBluescript SK(-)を切り出しクローニングを行った。クローニングされた DNA について、Primer Walking 法により、全塩基配列の解析を行った。その結果、該DNAは配列番号 24 で示される塩基配列の塩基番号 484~2186 で示される塩基配列を有していた。

## 20 実施例 10 (5'-RACE 法による完全長 cDNA の取得)

実施例 9 で取得した pBluescript SK(-) の EcoRI および XhoI 部位にクローニングされたプラスミドの配列情報から、完全長の cDNA を取得する必要があったため 5'-RACEkit (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0, Life Technologies 社製) を用いて 5' 末端配列を決定した。まず

ブルーギルの肝臓から Trizol 試薬 (Life Technologies 社製) を用いて製品マニュアルに従い全 RNA を抽出した。この全 RNA 約 5  $\mu$ g と配列番号 38 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて製品マニュアルに従い一本鎖 cDNA を作製した。cDNA を GlassMAX カラムを用いて精製後、terminal deoxynucleotidyl transferase と dCTP を用いて 5' 末端に oligdC-tail を製品マニュアルに従い付加した。次にこの oligdC-tail の付加した下 cDNA および製品添付の 5' RACEAbridged Anchor Primer および配列番号 39 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて製品マニュアルの条件に従い PCR (94°C1 分間次いで 55°C1 分間さらに 74°C2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行った。次に該 PCR 産物 1  $\mu$ l と製品添付の Universal Amplification Primer および配列番号 40 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて製品マニュアルに従い PCR (94°C1 分間次いで 55°C1 分間さらに 74°C2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行った。増幅された PCR 産物は 1 %アガロースゲル (アガロース L、日本ジーン社製) 電気泳動に供し、バンドを切り出しフェノールを用いて精製後、T ベクター (pGEM-T、プロメガ製) を用いて製品マニュアルに準じてクローニングを行いシーケンスを行った。その結果、配列番号 41 で示される塩基配列を有する PCR 断片が確認された。そこで、さらに配列番号 41 で示される塩基配列をもとに、oligdC-tail の付加した cDNA および製品添付の 5' RACEAbridged Anchor Primer および配列番号 42 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて製品マニュアルの条件に従い PCR (94°C1 分間次いで 55°C1 分間さらに 74°C2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行った。該 PCR 産物 1  $\mu$ l と製品添付の Universal Amplification Primer および配列番号 43 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて製品マニュアルに従い PCR

(94℃1 分間次いで 55℃1 分間さらに 74℃2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行った。増幅された PCR 産物は 1 %アガロースゲル (アガロース L、日本ジーン社製) 電気泳動に供し、バンドを切り出しフェノールを用いて精製後、T ベクター (pGEM-T、プロメガ製) を用いて製品マニュアルに準じてサブクローニングを行い取得したクローンのシーケンスを確認した。その結果、該 PCR 産物の配列は配列番号 4 4 で示される塩基配列であった。この PCR 産物の 5' 末端配列を用いたオリゴヌクレオチド (配列番号 4 5) と配列番号 4 6 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを用いて LA-Taq (宝酒造製) の製品マニュアルに従い PCR (94℃1 分間次いで 55℃1 分間さらに 74℃2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行い、1 %アガロースゲル (アガロース L、日本ジーン社製) 電気泳動に供し、約 1.7kbp の PCR 産物のバンドを切り出し、フェノール抽出後、ダイレクトシーケンス法により 5' 末端配列の確認を行った。この結果、本発明遺伝子 bger  $\beta$  は配列番号 2 4 で示す塩基配列を持つことがわかった。また、上記約 1.7kbp の PCR 断片を T ベクター (pGEM-T、プロメガ製) を用いて製品マニュアルに準じて大腸菌 DH5  $\alpha$  にサブクローニングを行いシーケンスを確認したプラスミドクローンを pGEM-BGER  $\beta$  と名付けた (以下、配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターを BGER  $\beta$  と記し、当該レセプターをコードする遺伝子を本発明遺伝子 bger  $\beta$  と記す)。このプラスミド pGEM-BGER  $\beta$  は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (IPOD) 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 2000 年 06 月 28 日に受託番号 FERM BP-7199 としてブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

実施例 1 1 (動物細胞発現用の本発明 bger  $\beta$  ベクターの構築)

RSV プロモーターを有する発現プラスミド pRc/RSV (Invitrogen 社)  $2 \mu\text{g}$  を、制限酵素 Hind III (10U) および Xba I (10U) で、 $37^\circ\text{C}$ にて終夜消化した。これをアガロース (アガロース S ; ニッポンジーン社製) を用いたゲル電気泳動に供し、 $5\sim 6\text{kbp}$  の長さを示すバンド部分からジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて DNA を回収しベクター DNA とした。一方、ブルーギルの肝臓から Trizol 試薬 (Life Technologies 社製) を用いて該試薬の製品マニュアルに従い全 RNA を調製し、THERMOSCRIPT RT-PCRkit (Life Technologies 社製) を用いてキット添付のランダムプライマーを使用してキット添付のマニュアルに従い cDNA を作製した。該 cDNA を鋳型として、配列番号 47 で示される塩基配列からなるオリ  
 10 ゴヌクレオチドおよび配列番号 48 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて LA-Taq (宝酒造製) にて PCR ( $94^\circ\text{C}$ 1 分間次いで  $55^\circ\text{C}$ 1 分間さらに  $74^\circ\text{C}$ 2.0 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル) を行い本発明遺伝子 bger  $\beta$  の DNA を増幅した。これをクロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させ、TE を加えて溶解させた後、T ベクター (pGEM-T、プロメガ製) を用いて製品マニュアルに準じてサブクローニングを行い取得したクローンのシーケンスを確認した。そのプラスミドクローンを制限酵素 Hind III および XbaI で  $37^\circ\text{C}$ で 5 時間消化した。次いで、該消化物を 1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約  $1.7\text{kbp}$  の DNA を含むゲル部分を切り出し、これに含まれる DNA をジーンクリーン (フナコシ  
 15 社製) を用いて精製した。その約  $100\text{ng}$  を上記のように調製したベクター DNA 約  $50\text{ng}$  と混合し、Ligation kit ver. 2 (宝酒造社製) により  $16^\circ\text{C}$ にて終夜ライゲーションを行なった。この反応液中の DNA を大腸菌 DH5  $\alpha$  株コンピテントセル (TOYOBO 製) に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミド DNA をアルカリ法で調製した。得られたプラス



ミド DNA の塩基配列を解析し本発明遺伝子 bger  $\beta$ を発現する該プラスミドを p Rc/RSV-BGER  $\beta$ と名付けた。

# 実施例 1 2 (レポーター遺伝子アッセイ用のレポータープラスミドの作製)

- 5 Isogen 試薬 (ニッポンジーン社製) を用いて該試薬に添付のプロトコールに記載の方法で、アフリカツメガエルのゲノム DNA を精製した。該ゲノム DNA を鋳型として、Walker らの報告 (Nucleic acid Res. (1984) 12, 8611-8626) を参考に PCR を行なうことにより、アフリカツメガエルビテロゲニン遺伝子上流の TATAbox からエストロゲンレセプター応答配列までを含む DNA を増幅した。
- 10 増幅された DNA を回収し、その末端を Blunting kit (宝酒造社製) を用いて平滑化した (以下、該 DNA を ERE DNA と記す。)

- マウスメタロチオネイン I 遺伝子の TATA box 近傍の塩基配列とリーダー配列 (Genbank Accession No. J00605) に由来する塩基配列 (配列番号 3 2 および配列番号 3 3) からなる 2 本のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせて 2 本鎖
- 15 DNA とし、これに T4 ポリヌクレオチドカイネースを作用させてその両末端をリン酸化した (以下、該 DNA を TATA DNA と記す。)。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド pGL3 (プロメガ社製) を制限酵素 Bgl II および Hind III で消化した後、これに Bacterial alkaline phosphatase (BAP) を加えて 65°C で 1 時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース (AgaroseL; ニッポンジ
- 20 ーン社製) を用いた電気泳動に供し、pGL3 由来のルシフェラーゼ遺伝子を含む Bgl II-Hind III 断片の DNA を回収した。該 DNA 約 100ng と、前記の TATA DNA 1  $\mu$ g とを混合し、T4 リガーゼで結合させることによりプラスミド pGL3-TATA を作製した。次に、pGL3-TATA を制限酵素 Sma I で消化した後、BAP を加えて 65°C で 1 時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分

のゲルから DNA を回収した。該 DNA 約 100ng と、上記 ERE DNA 約 1  $\mu$ g とを混合して T4 リガーゼを反応させた後、該反応液中の DNA を DH5  $\alpha$  コンピテントセル (TOYOBO 社製) へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数  
5 個からそれぞれの保有するプラスミドの DNA を調製し、これらを制限酵素 Kpn I および Xho I で消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。  
pGL3-TATA の Sma I 部位に ERE DNA が 1 コピー導入された構造を有するプラスミドを pGL3-TATA-ERE と名付け、また、前記 Sma I 部位に ERE DNA が 5 コピー導入された構造を有するプラスミドをプラスミド pGL3-TATA-ERE x 5 とした。

#### 10 実施例 13 (一過性発現系によるレポーターアッセイ)

HeLa 細胞を 10 cm プレートに約  $2 \times 10^6$  細胞播種し、チャコールデキストラ  
ン処理済み FBS (以下、FBS と記す。) が 10 % となるよう添加された E-MEM 培地  
で、5 %CO<sub>2</sub> 条件下 37 °C にて 1 日培養を行った。培養後、細胞に、Lipofectamine  
(Life Technologies 社製) を用いてそのプロトコールに従い 3.75  $\mu$ g の  
15 pRc/RSV-BGER  $\beta$  および 3.75  $\mu$ g の pGL3-TATA-ERE x 5 を同時に導入した。37 °C  
にて 16 時間培養後、培地を交換しさらに 3 時間培養した。その後、細胞を集め  
て FBS が 10 % となるよう添加された E-MEM 培地に懸濁して均一化し、予め DMSO  
で溶解した様々な濃度のエストラジオール (和光純薬社製)、ジェチルスチルベ  
ステロール (DES) (ナカライテスク社製)、p-ノニルフェノール (関東化学社製)、  
20 ビスフェノール A (和光純薬社製)、1 mM のダイゼイン (シグマ社製)、ゲニス  
テイン (和光純薬社製)、(和光純薬社製)、クメステロール (INDOFINE Chemical  
社製) または o, p'-DDT (Lancaster 社製) を添加した 96 穴プレート (DMSO 終濃  
度 0.1 %) に播種した。また、抗エストロゲン作用を測定するために、同様に様々  
な濃度の 4-ヒドロキシタモキシフェン (住友化学で合成) と 10 nM のエストラ

ジオールとを同時に添加した 96 穴プレート (DMSO 終濃度 0.1 %) に上記細胞を播種した。細胞が播種された 96 穴プレートは 37 °C にて約 40 時間培養した後、5 倍に希釈した細胞溶解剤 PGC50 (ニッポンジーン社製) を 50  $\mu$ l/well ずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて 30 分間放置して細胞を溶解させた。このように調製された細胞溶解液を 10  $\mu$ l ずつ 96 穴白色サンプルプレート (ベルトールド社製) に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーター LB96p (ベルトールド社製) で 50  $\mu$ l/well ずつ酵素基質液 PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を 5 秒間測定した。結果を図 14 ~ 22 に示す。上記のように、本発明遺伝子 bger  $\beta$  を用いたルシフェラーゼレポーター

5

10

アッセイによって、被験物のエストロゲンレセプター活性化能または活性化阻害能を測定することができた。さらに、他の被験物を同様に試験することにより、エストロゲンレセプター活性化能を有する物質またはエストロゲンレセプター活性化阻害能を有する物質を検出することができる。

15 実施例 14 (本発明遺伝子が染色体に導入されたレポーターアッセイ用形質転換体の作製)

プラスミド pUCSV-BSD (フナコシ社から購入) を BamHI で消化し、プラストサイジン S デアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードする DNA を調製する。該 DNA と、実施例 12 記載のプラスミド pGL3-TATA-ERE を BamHI で消化し BAP 処理して得られた DNA とを混合して、T4 リガーゼを反応させた後、該反応液中の DNA を大腸菌 DH5  $\alpha$  コンピテントセル (TOYOBO 製) に導入する。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミド DNA を調製し、それぞれを制限酵素 BamHI で消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析する。プラストサイジン S デアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミド pGL3-TATA-ERE の

20

BamHI 切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミド pGL3-TATA-ERE-BSD とする。

次に、ヒト由来の HeLa 細胞に、上記のように作製されたプラスミド pGL3-TATA-ERE-BSD の DNA、および、実施例 11 のようにして本発明遺伝子が  
5 pRc/RSV に組込まれた発現ベクターの DNA を、それぞれ直鎖化して導入し、これらの DNA が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得する。

まず、プラスミド pGL3-TATA-ERE-BSD の DNA、および、本発明遺伝子が pRc/RSV に組込まれた発現ベクターの DNA をそれぞれ Sal I で消化する。

HeLa 細胞は、10%FBS を含む DMEM 培地（日水製薬社製）を用いて 37℃にて  
10 5%CO<sub>2</sub> 存在下に、直径約 10cm のシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養する。約 5 x 10<sup>5</sup> の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクチン（GIBCO 社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドの DNA を同時に導入する。リポフェクション法の条件はリポフェクチンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間 5 時間、直鎖化されたプラスミド DNA の総量 7 μg  
15 （各々 3.5 μg）/シャーレ、リポフェクチン量は 20 μl /シャーレとする。リポフェクション後、10%FBS を含む DMEM 培地中でそのまま 3 日間培養する。次に、細胞をトリプシン処理でシャーレから剥がし、1/10 量ずつ新しい 10 枚のシャーレに播種し、そのまま翌日まで培養する。次に、G418（SIGMA 社製）を最終濃度 400 μg/ml となるように、および、ブラストサイジン S を最終濃度 8 μg/ml と  
20 なるように培養液に添加し、培養を継続する。一週間後、G418 およびブラストサイジン S を前記と同じ濃度含む新しい培地に交換し、更に培養を継続する。一週間後、同じ操作を再度行う。さらに一週間後、倒立型顕微鏡でシャーレを観察し、直径数 mm のコロニー 30 個をそれぞれ、あらかじめ培地を分注しておいた 96 穴ビュープレート（ベルトールド製）の各ウェルに移し、さらに培養を続け

- る。細胞をコンフルエントになる前にトリプシン処理により剥がして回収し、3  
等分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種する。1枚はそのまま継代と  
培養を続け、残り2枚の内的一方には最終濃度50nMとなるようE2を加え、も  
う一方には何も加えずに、それぞれを2日間培養する。2日後、それぞれの培養  
5 上清を除き、200  $\mu$ l/well のPBS(-)で細胞を2回洗浄した後、5倍に希釈した  
PGC50 (ニッポンジーン社製) を20  $\mu$ l ずつ加えて、室温に30分間放置し細胞  
を溶解させる。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメー  
ターLB96p (ベルトールド社製) にそれぞれセットし、50  $\mu$ l の基質液 PGL1000  
(ニッポンジーン社製) を自動分注しながら、ルシフェラーゼ活性を測定する。  
10 E2 が添加された系の方が、E2 が添加されていない系に比べ、2倍以上高いルシ  
フェラーゼ活性を示す形質転換体を選抜する。

実施例 15 (本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いるレポーター  
アッセイ)

- 15 実施例 14 に記載のようにして作製される HeLa 細胞の形質転換体を 24 穴  
プレートに約  $4 \times 10^4$  細胞/well ずつ播種し、10%のチャコールデキストラン処理  
済みFBS、400  $\mu$ g/ml のG418および8  $\mu$ g/ml のブラストサイジンSを含むE-MEM  
培地 (以下、FBS および抗生物質含有 E-MEM 培地と記す。) で、5 %CO<sub>2</sub> 条件下  
37℃にて1日間培養を行う。被験物をDMSO (和光純薬社製) に溶解させ最終濃  
20 度が1nM から50  $\mu$ M となるよう添加したFBS および抗生物質含有 E-MEM 培地、  
前記の被験物溶解液と同量のDMSOを添加したFBS および抗生物質含有 E-MEM 培  
地、及びE2をDMSOに溶解させ最終濃度1  $\mu$ Mとなるよう添加したFBS および抗  
生物質含有 E-MEM 培地を調製し、これを前記の細胞の培養上清と交換する。該  
細胞をCO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養し、24時間後に培養上清を除き、ウェル

に接着している細胞を剥がさないように 1 ml/ウェルの PBS (一) でウェルを 2 回洗浄し、5 倍に希釈した細胞溶解剤 PGC50 (ニッポンジーン社製) を 50  $\mu$ l /well ずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて 30 分間放置して細胞を溶解させる。このように調製された細胞溶解液を 10  $\mu$ l ずつ 96 穴白色サンプルプレート (ベ

5 ルトールド社製) に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーター LB96p (ベルトールド社製) で 50  $\mu$ l /well ずつ酵素基質液 PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を 5 秒間測定する。

このような本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、エストロゲンレセプター活性化能を有

10 する物質を含む被験物を見出すことができる。

実施例 16 (本発明 BGER  $\beta$  のリガンド結合領域と転写調節因子の DNA 結合領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含むベクターの作製)

本発明遺伝子 bger  $\beta$  の部分塩基配列を有する DNA を含有するプラスミド

15 pGEM-BGER  $\beta$  を鋳型として、配列番号 34 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 35 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて PCR (94°C 1 分間次いで 55°C 1 分間さらに 74°C 1.5 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 25 サイクル) を行うことにより、配列番号 24 で示される塩基配列の塩基番号 763~1767 で表される塩基配列を有し本発明

20 BGER  $\beta$  のリガンド結合領域をコードする DNA を増幅した。増幅された DNA は、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。この DNA に TE を加えて溶解させた後、制限酵素 EcoRI と SalI とで 37°C にて約 5 時間消化した。消化物を 1% アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約 1000 bp の DNA を含むゲル部分を切り出し、これに含まれる

DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて回収した。一方、GAL4 蛋白の DNA 結合領域とのキメラ蛋白作製用ベクター pGBT9（Clontech 社製）（約 50ng）を EcoRI および SalI で消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して、EcoRI および SalI で消化されたベクター DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて回収した。該ベクター DNA と前記回収 DNA 約 10ng とを混合し、同容量のライゲーション液（宝酒造製ライゲーションキット）を加え、16℃で約 5 時間保温し、次いでコンピテントセル DH5  $\alpha$ （TOYOBO 社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミド DNA をアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、pGBT9-BGER  $\beta$ LIID と名付けた。このプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーハイブリッドアッセイに使用することができる。

実施例 17（転写共役因子のレセプター結合領域と転写調節因子の転写活性化領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含有するベクターの作製）

ヒト脳由来 mRNA（Clontech 社製）と RT-PCR キット（宝酒造製）を用いて製品添付のプロトコールに従い cDNA を作製した。そして、該 cDNA を鋳型として、配列番号 36 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号 37 で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて PCR（94℃で 1 分間次いで 55℃で 1 分間さらに 72℃で 2.5 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル）を行い、転写共役因子 TIF2 のアミノ末端から 624 番目のアミノ酸から 1287 番目のアミノ酸までをコードする DNA を増幅した。増幅された DNA は、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70 %エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。この DNA に TE を加えて溶解させた後、制限酵素 EcoRI と BglII とで 37℃で 5 時間消化した。消化物を 1%アガ

- ロースゲル電気泳動に供して分離し、約 2.0k bp の DNA を含むゲル部分を切り出し、これに含まれる DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて精製した。一方、GAL4 蛋白の転写活性化領域とのキメラ蛋白作製用ベクター pGAD424（Clontech 社製）（約 50 ng）を EcoRI および BamHI で消化した後、アガロース
- 5 ゲル電気泳動に供して消化されたベクター DNA をジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて回収した。該ベクター DNA と前記精製 DNA 約 10ng とを混合し、同容量のライゲーション液（宝酒造製ライゲーションキット）を加え、16 °C で約 1 時間保温し、次いでコンピテントセル DH5  $\alpha$ （TOYOBO 社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミド DNA をアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、pGAD424-TIF2RID と名付けた。このプラスミドは、それぞれ宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーハイブリッドアッセイに使用することができる。
- 10
- 15 実施例 18（出芽酵母細胞を宿主細胞とするツーハイブリッドシステムの作製）
- 酵母 Y190（Clontech 社製）を Matchmaker Two-Hybrid System（Clontech 社製）のマニュアルに従い YPD 培地で 30°C にて終夜振盪培養した。該酵母を集菌後、その細胞内に、実施例 16 記載の pGBT9-BGER  $\beta$ LID と実施例 17 記載の pGAD424-TIF2RID とを、Yeastmaker yeast transformation system（Clontech
- 20 社製）を用いて導入した。前記プラスミドの導入された酵母細胞は、トリプトファンおよびロイシンを含まない SD プレート上に播き、30 °C で約 2 日間培養した。培養後、コロニーを選択し再びトリプトファンおよびロイシンを含まない SD プレート上に塗布し、30 °C で約 2 日間培養した。



# 実施例 19 (酵母ツーハイブリッドシステムを用いた被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の測定)

実施例 18 で調製された酵母の一部をトリプトファンおよびロイシンを含まない SD 培地 1 ml に植菌し、30 °C で終夜振盪培養し、得られた培養液をトリプトファンおよびロイシンを含まない SD 培地で約 80 倍に希釈した。96 穴のディープウェルプレート

5 の各ウェルに DMSO に溶解した様々な濃度のエストラジオール (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製) および 1  $\mu$ M のジェチルスチルベステロール (DES) (ナカライテスク社製)、1 mM のビスフェノール A (和光純薬社製)、100  $\mu$ M の p-ノニルフェノール (関東化学社製)、100  $\mu$ M のゲニステイン (和光純薬社製)、100  $\mu$ M のクメステロール (INDOFINE Chemical 社製)、1 mM のダイゼイン (シグマ社製)、1 mM のメトキシクロル (和光純薬社製)、1 mM の o, p'-DDT (Lancaster 社製) 2.5  $\mu$ l を加え (DMSO 終濃度 1 %とする)、ここへ上記培養酵母希釈液を 250  $\mu$ l を添加して、30 °C で 4 時間振盪培養した。培養後、各ウェルから酵母液 100  $\mu$ l

10 を回収しこれに 100  $\mu$ l の  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性測定用発光反応液 (Gal-Screen、Tropix 社製) を加え、約 1.5 時間室温で保温した後、ルミノメーター LB96p (ベルトールド社製) で発光量を測定した。図 23 にエストラジオール (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製) の濃度依存的な活性誘導の結果を示す。また図 24 に終濃度 10 nM の

20 ジェチルスチルベステロール (DES)、10  $\mu$ M のビスフェノール A、1  $\mu$ M の p-ノニルフェノール、1  $\mu$ M のゲニステイン、1  $\mu$ M のクメステロール、10  $\mu$ M のダイゼイン、1  $\mu$ M のメトキシクロルまたは 10  $\mu$ M の o, p'-DDT の活性誘導結果を示す。

実施例 20 (本発明遺伝子を含むウイルスベクター及びウイルス粒子の作製)

実施例 11 のようにして調製された本発明ベクター pRc/RSV-BGER  $\beta$  の DNA 2  $\mu$ g を 10U の制限酵素 SpeI および XbaI で 37 °C にて 1 時間消化した後、低融点アガロースゲル電気泳動に供し約 1.7 kbp の DNA を回収する。この DNA を blunting kit (宝酒造製) を使用してマニュアルに従い平滑化する。一方、2  $\mu$ g の pVL1392 ベクター DNA を 10U の制限酵素 SmaI で消化し、10U のアルカリフ

5 オスファターゼで 65 °C にて 1 時間処理後、低融点アガロースゲル電気泳動に供し DNA を回収する。回収された pVL1392 ベクター DNA 100 ng に、上記のように

10 pRC/RSV-FMER  $\alpha$  から調製した約 1.8 bp の DNA を約 100 ng 加え、5U の T4 Ligase を用いて 16 °C にて 3 時間保温する。これを E. coli DH5  $\alpha$  株のコンピテントセル (TOYOBO 社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミド DNA をアルカリ法で調製する。それぞれのプラスミド DNA 約 1  $\mu$ g を 10U の制限酵素 XbaI で 37 °C にて 1 時間消化した後アガロース S (ニ

15 ッポンジーン社製) を用いたアガロース電気泳動で分析し、約 1.7kbp のバンドが検出されるクローンを選択する。該クローンからプラスミド DNA をアルカリ法にて調製し、組換え Baculo virus 作製に用いるトランスファーベクター pVL1392-BGER  $\alpha$  とする。1  $\times$  10<sup>6</sup> 個の Sf21 細胞 (ATCC から入手) を 75cm<sup>2</sup> の T 型

20 フラスコ (ファルコン社製) 中で 10% FBS および 2 % Yeastlate を含む Grace's medium (以下、FBS 含有 Grace 培地と記す。) を用いて 27 °C にて一晩培養する。

一方、上記のようにして作製されるトランスファーベクター pVL1392-BGER  $\alpha$  の DNA 10  $\mu$ g と、直鎖状に調製されたウイルスゲノム DNA Baculo gold (Pharmingen 社製) 20ng とを Grace's medium 100  $\mu$ l に添加し、滅菌水で 2 倍に希釈したりポフエクチン (GIBCO 社製) 10  $\mu$ l を加え、室温にて 30 分間放置する。一晩培

養された前記の Sf21 細胞の培養上清を除き、血清を含まない Grace's medium 少量で細胞を洗った後、同培地 5ml を細胞に添加し、これに前記のリポフェクチン-DNA 混合液を全量加え、27°Cにて 3 時間保温する。次いで、FBS 含有 Grace 培地で細胞を洗った後、FBS 含有 Grace 培地 20ml を細胞に添加し、5 日間 27°C 5 にて培養する。5 日目に培養上清を回収して 50ml 容の遠心チューブに採り、5000xg で 15 分間遠心分離することにより細胞の破片を沈殿させ、遠心上清を回収する。この上清全量を 100,000xg で 24 時間遠心分離し、ウイルス粒子をペレットとして得る。このペレットを 100  $\mu$ l の TE に懸濁し、当量の TE 飽和フェノールを加え、穏やかに室温にて 24 時間混合する。これを 10,000xg、10 分間遠心分離した後、水層を回収し、これに当量のクロロホルムを加え 10 分間穏やかに混 10 合し、再度 10,000xg、10 分間の遠心分離を行う。水層を回収し、該水層に終濃度 0.2M となる量の NaCl と 2.5 倍量のエタノールを加え、本発明遺伝子を保有するウイルスベクターの DNA を沈殿として回収する。

# 15 実施例 21 (本発明遺伝子を含むウイルスベクターが Sf21 細胞へ導入された形質転換体の作製と本発明のエストロゲンレセプターの製造)

Sf21 細胞 (ATCC から入手) を 75cm<sup>2</sup> の T 型フラスコ (ファルコン社製) に 1 x 10<sup>6</sup> 個ずつ計 10 枚播種し、27°Cにて FBS 含有 Grace 培地で培養する。この細胞に、実施例 19 のように調製される組換えウイルス粒子を含む培養上清を 20 10  $\mu$ l / フラスコの割合で加え、そのまま 4 日間培養する。この培養上清を採取し、前記と同様に 75cm<sup>2</sup> の T 型フラスコ (ファルコン社製) 10 枚に培養した前 Sf21 細胞へ、該培養上清をフラスコ一枚あたり 1ml ずつ加え、60 時間培養する。60 時間後、細胞をピペッティングにより懸濁してフラスコより回収し、得られた細胞懸濁液を 5,000 xg で 15 分間遠心分離しペレットとする。この細胞

のペレットを 20mM HEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF バッファーに懸濁した後、得られる細胞懸濁液をダウンス型ガラスホモジナイザーで上下に 30 回ホモジナイズし細胞を破碎する。この破碎液を 30,000x g で 1 時間遠心分離して上清画分を回収することにより、本発明のエストロゲンレセプターを含む画分

5      を得る。

## 実施例 22 (レセプターバインディングアッセイ)

結合反応バッファーは、最終組成が 20mM HEPES-KOH pH7.9, 10mM モリブデン酸ナトリウム, 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 0.5mM PMSF (いずれも和光純薬社製)

10      となるように調製する。反応系は総容量を 100  $\mu$ l とし、本発明のエストロゲンレセプターを含む細胞抽出物を 10  $\mu$ g 蛋白質添加し、トリチウム標識された E2 を 1pM から 100nM 程度になるよう添加する。非特異的結合を調べるための試験区には標識されていない E2 を最終濃度 10  $\mu$ M になるようにさらに加える。

結合反応は、以下のように行う。反応液を氷上で 15 時間保温した後、チャ

15      コールデキストラン液[組成: 10mM Tris-HCl, 0.2%の酸洗活性炭 (ナカライテスク社製 NoritA)、0.005%ファルマシア Dextran T70]を 100  $\mu$ l 加え、10 分間氷上に放置する。この反応液を低速遠心機で 1,000xg で 10 分間遠心分離して活性炭を沈殿させ、上清を 100  $\mu$ l 分取し、その放射エネルギーを液体シンチレーション

20      カウンターで測定する。この測定値を基に、該上清画分中の標識 E2 量、すなわち、レセプターに結合した標識 E2 量 (結合型標識リガンド量) を求める。標識 E2 のみが添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識 E2 のレセプターに対する全結合量に相当する。一方、標識 E2 に加え標識されていない E2 が添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識 E2 のレセプターに対する非特異的結合量に相当する。各種濃度の標識 E2 が添加された反応系それぞれについて、

全結合量から非特異的結合量を差し引いて、その反応系における標識リガンドのレセプターに対する特異的結合量を求める。次いで、Y 軸に（特異的結合標識リガンド濃度/遊離標識リガンド濃度）、X 軸に特異的結合標識リガンド濃度をプロットし、スキッチャード解析することにより、本発明のエストロゲンレセプターの E2 に対する Kd 値を求める。

- 5 エストロゲンレセプターに対する被験物の親和性を測定するには、上記と同様にして 1nM 程度のトリチウム標識 E2 が入っているバインディングアッセイ結合反応液へ被験物を終濃度が 1%程度となるよう添加する。なお被験物が添加されない系には、被験物と同量の溶媒を系に加える。被験物添加によりレセプターに対する標識 E2 の結合量が低下する場合は、その被験物にはエストロゲンレセプターに結合するような物質が含まれると判断される。
- 10

#### 産業上の利用可能性

- 本発明により、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系に利用することのできる新たなエストロゲンレセプター遺伝子等が提供可能となる。
- 15

#### 配列表フリーテキスト

##### 配列番号 6

- 20 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 10

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

5 配列番号 11

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 12

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 13

10 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 14

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 15

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

15 配列番号 16

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 17

プロモーターDNA を作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 18

20 プロモーターDNA を作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 19

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 20

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 1

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 2

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

5 配列番号 2 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 8

10 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 3 0

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

15 配列番号 3 1

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 3 2

プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 3

20 プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 4

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 3 5

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー



請求の範囲

1. 下記の (a) ~ (f) のいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

- (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列
- 5 (b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列
- (c) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列
- (d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
- (e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
- 10 (f) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列に対して 85% 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列

2. 下記の (g) ~ (i) のいずれかの塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

- (g) 配列番号 2 で示される塩基配列の塩基番号 424 ~ 1941 で表される塩基配列
- (h) 配列番号 5 で示される塩基配列の塩基番号 74 ~ 1819 で表される塩基配列
- 20 (i) 配列番号 2 4 で示される塩基配列の塩基番号 106 ~ 1767 で表される塩基配列

3. 請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子を含有するベクター。

4. エストロゲンレセプター遺伝子にプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項 3 記載のベクター。

5. ベクターがウイルスである請求項 3 記載のベクター。

5

6. 請求項 5 記載のベクターを含有するウイルス粒子。

7. 宿主細胞内で複製可能なベクターに請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子を組込む工程を含有するベクターの製造方法。

10

8. 請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

9. 請求項 3 記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質

15 転換体。

10. エストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる請求項 8 記載の形質転換体。

20

11. 宿主細胞が動物細胞、である請求項 8 記載の形質転換体。

12. 宿主細胞が哺乳類動物細胞である請求項 8 記載の形質転換体。

1 3. 宿主細胞が昆虫類動物細胞である請求項 8 記載の形質転換体。

1 4. 宿主細胞が酵母細胞である請求項 8 記載の形質転換体。

5

1 5. 請求項 1 記載の遺伝子または請求項 3 記載のベクターを宿主細胞に導入する工程を含有する形質転換体の製造方法。

10 1 6. 請求項 8 記載の形質転換体を培養する工程およびエストロゲンレセプターを産生させる工程を含有するエストロゲンレセプターの製造方法。

1 7. 請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子の部分塩基配列を有する DNA。

15

1 8. 部分塩基配列が、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列である請求項 1 7 記載の DNA。

20 1 9. 下記の (a) ~ (f) のいずれかのアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列

(c) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 9 5 % 以上のアミノ酸同一

性を示すアミノ酸配列

(e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して 95% 以上のアミノ酸同一

性を示すアミノ酸配列

(f) 配列番号 23 で示されるアミノ酸配列に対して 85% 以上のアミノ酸同

5 一性を示すアミノ酸配列

20. エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子とが導入されている形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前  
10 記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含有する被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法。

21. 請求項 19 記載のエストロゲンレセプターと被験物とを接触させ保温する工程を含有するレセプターバインディングアッセイ。

15

22. リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターとがリガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーマイブリッドシステムにおいて、被験物のエスト  
20 ロゲンレセプター活性調節能を測定するための請求項 1 記載のエストロゲンレセプター遺伝子の使用。

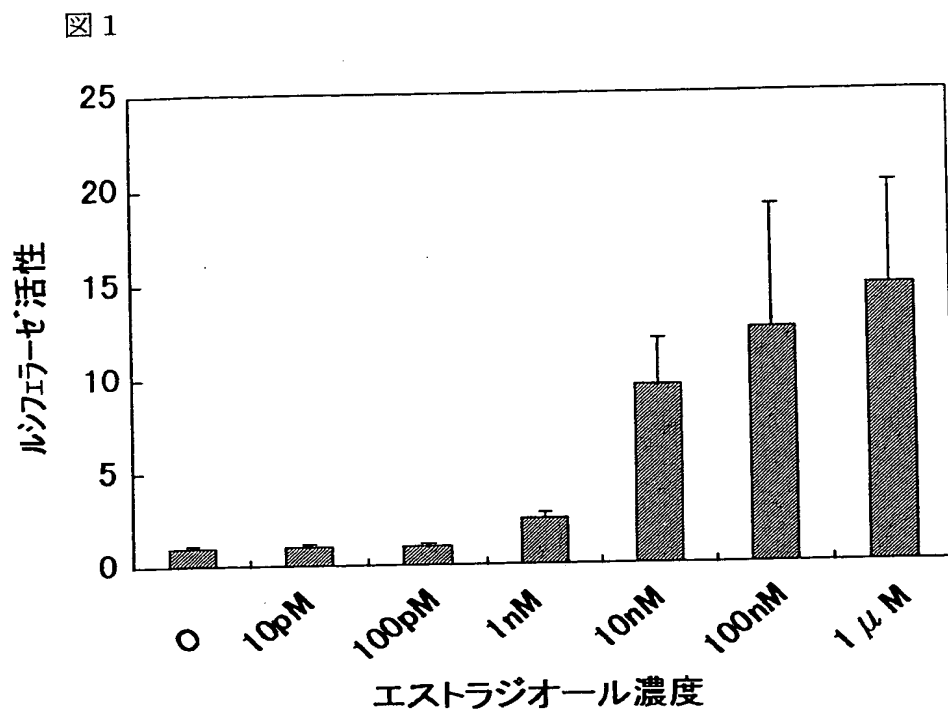
23. リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲン

レセプターのリガンド結合領域とがリガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための請求項 17 記載の DNA の使用。

## 要約書

下記のいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

- 5    (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列
- (b) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列
- (c) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列
- (d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列に対して 9 5 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
- 10   (e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列に対して 9 5 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列
- (f) 配列番号 2 3 で示されるアミノ酸配列に対して 8 5 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列



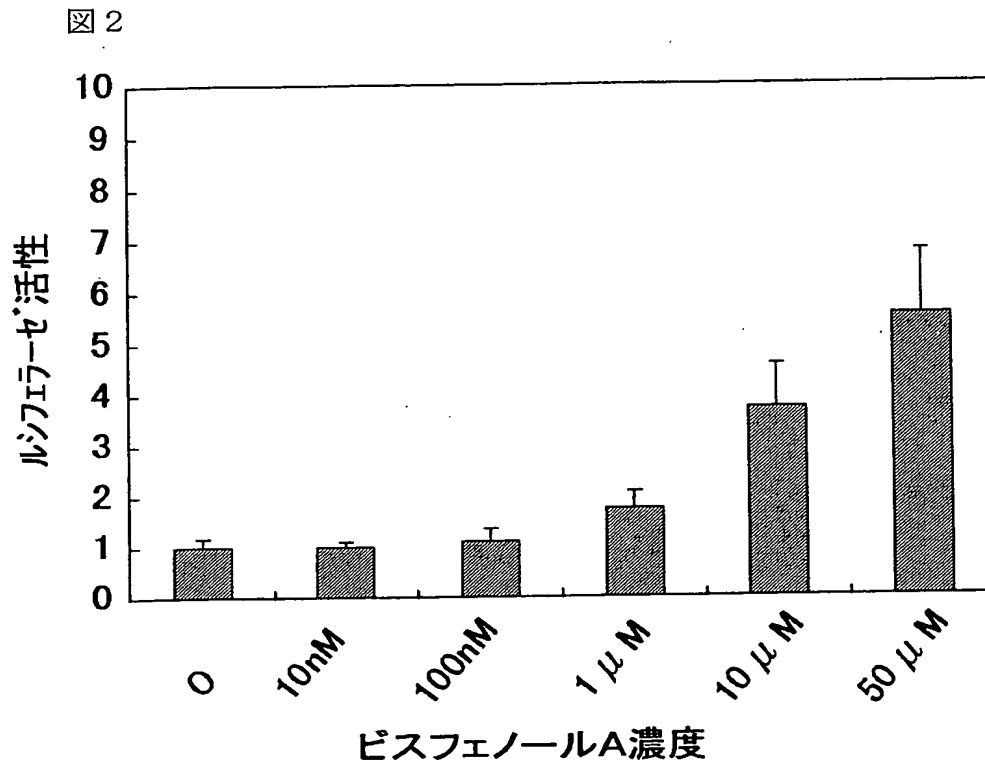




図 3

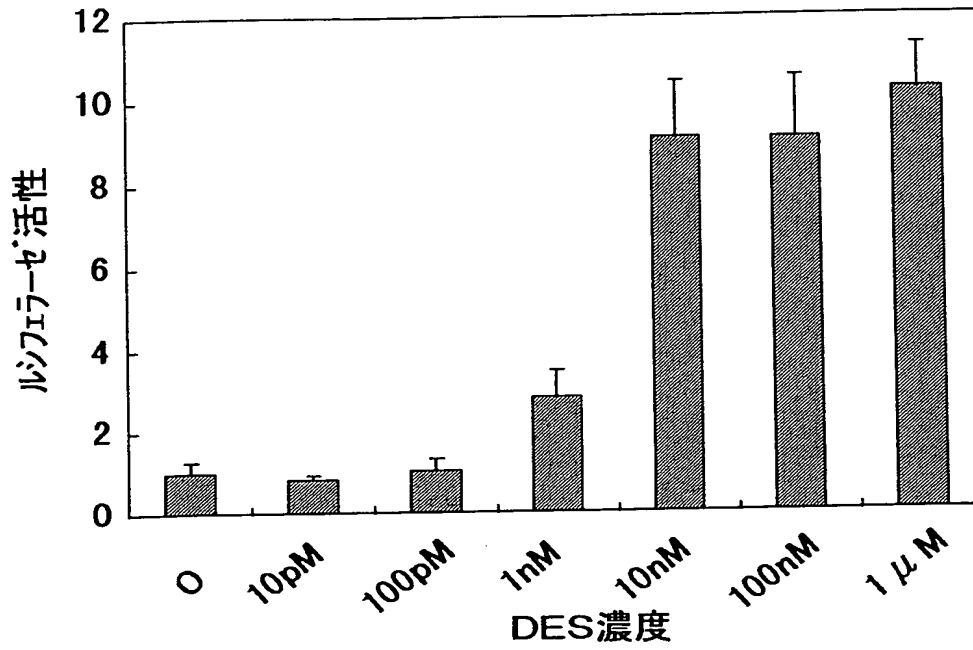


図 4

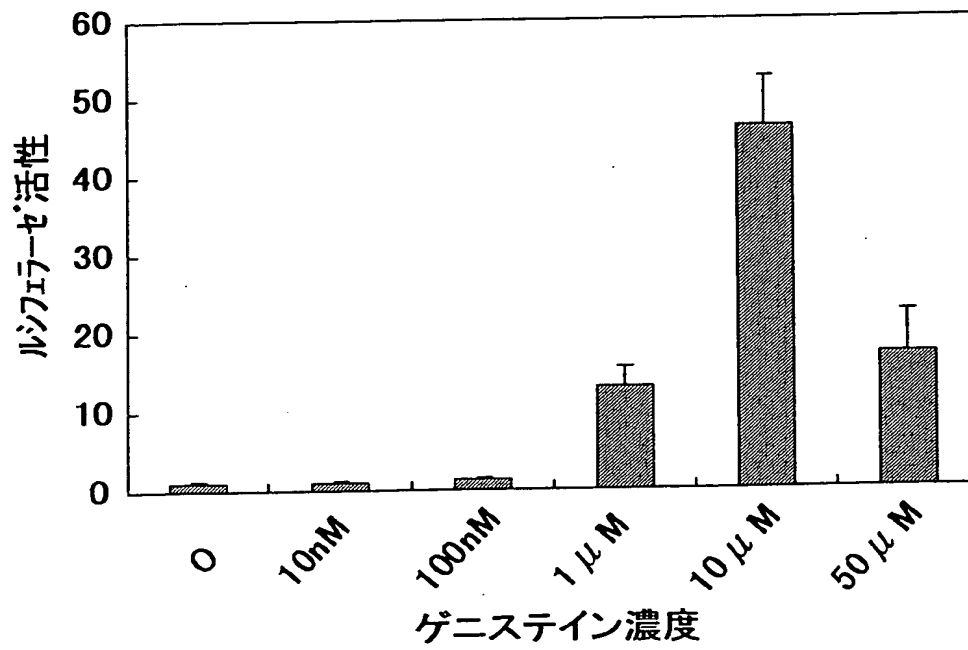


図 5

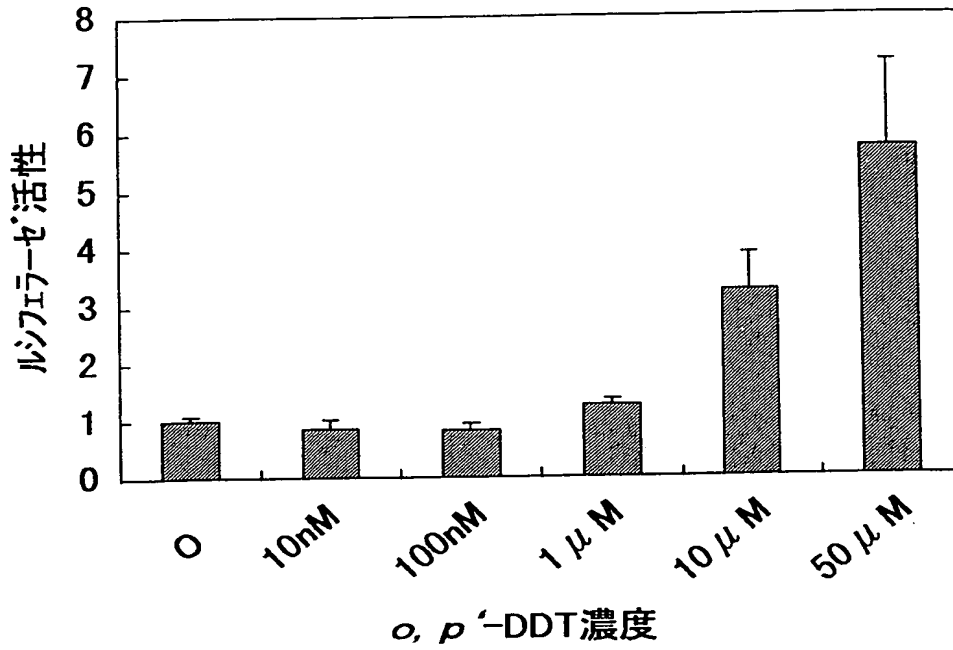


図 6

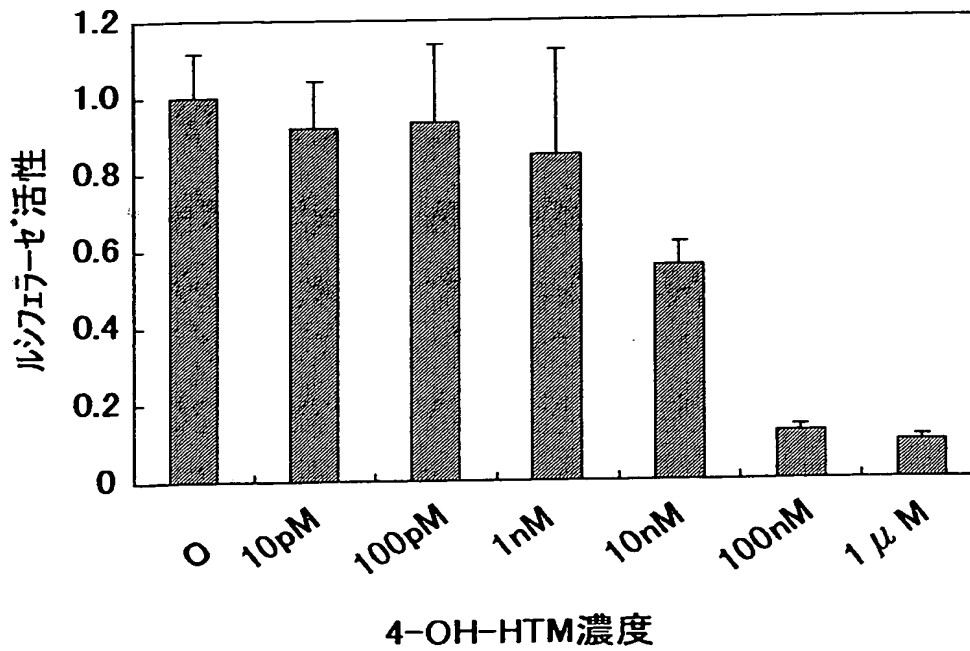


図 7

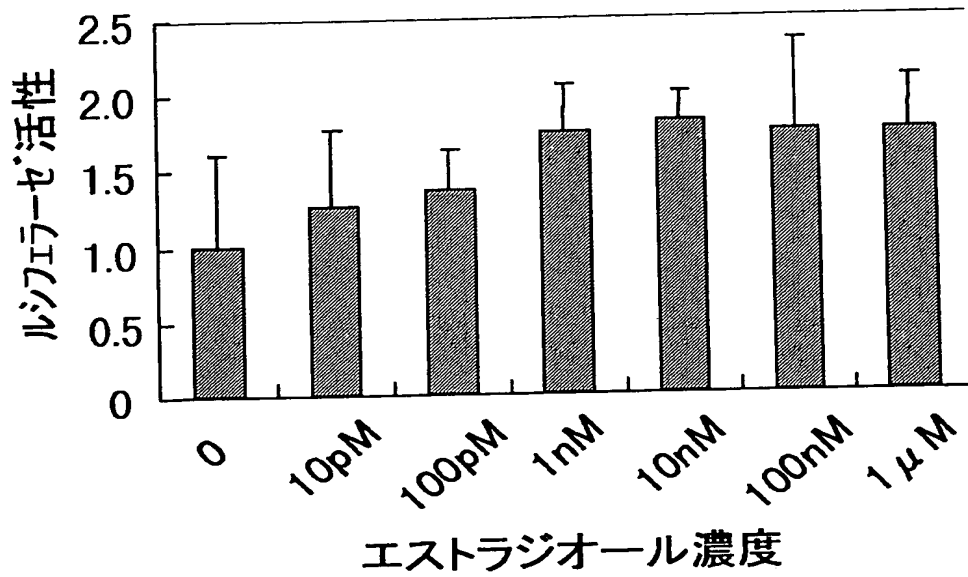


図 8

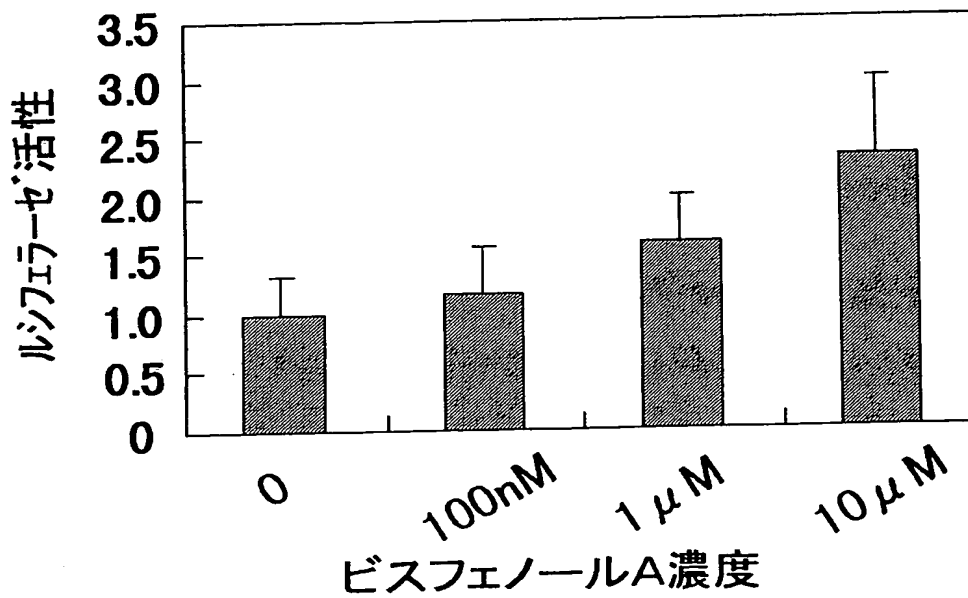


図 9

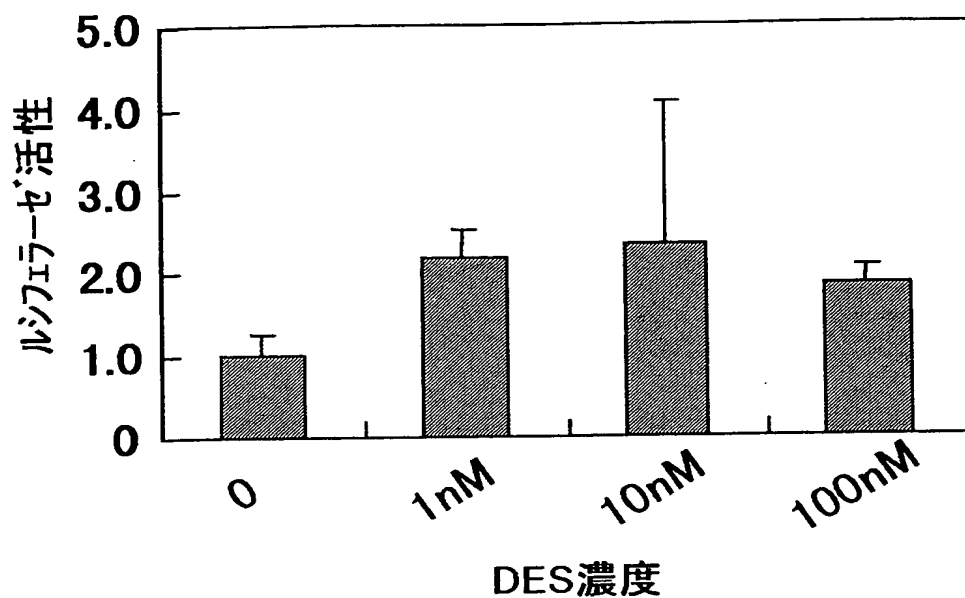


図 10

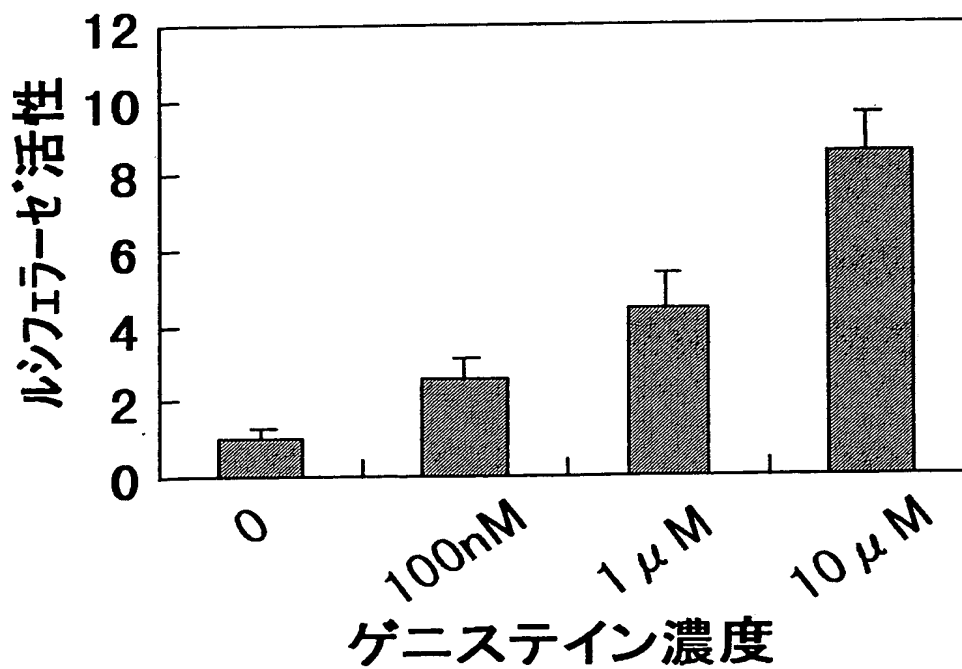


図 1 1

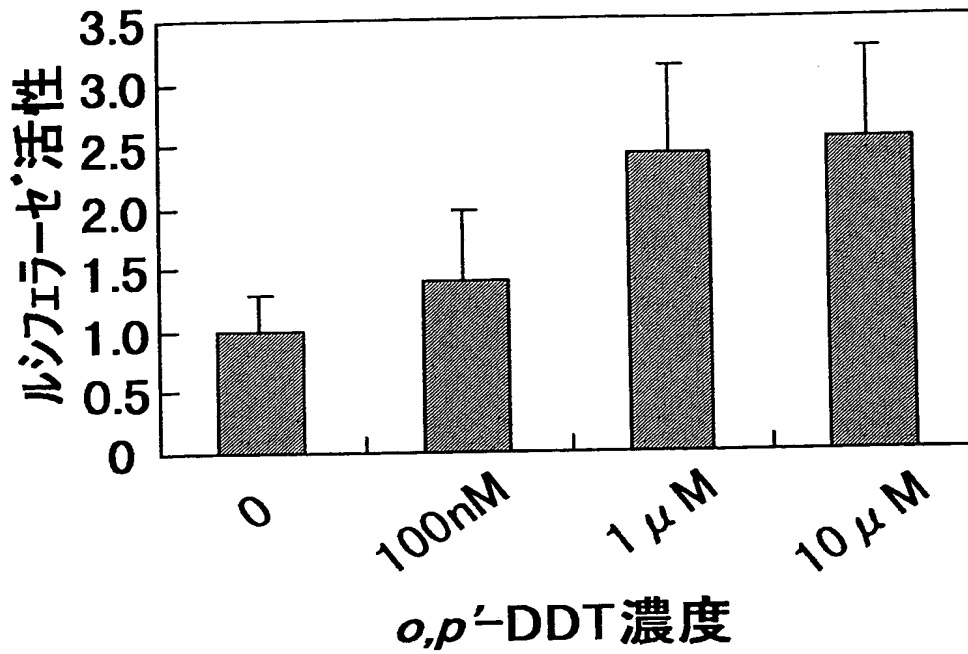


図 1 2

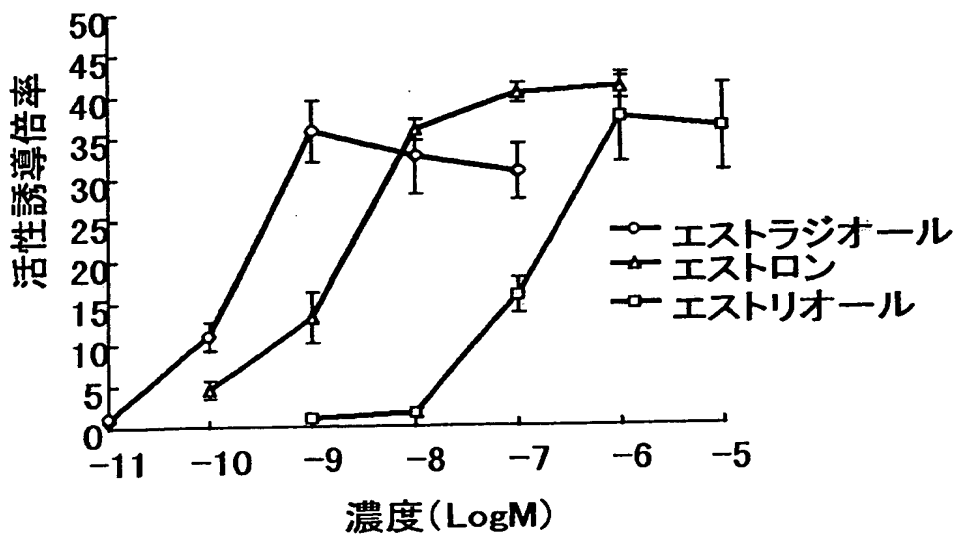


図 1 3

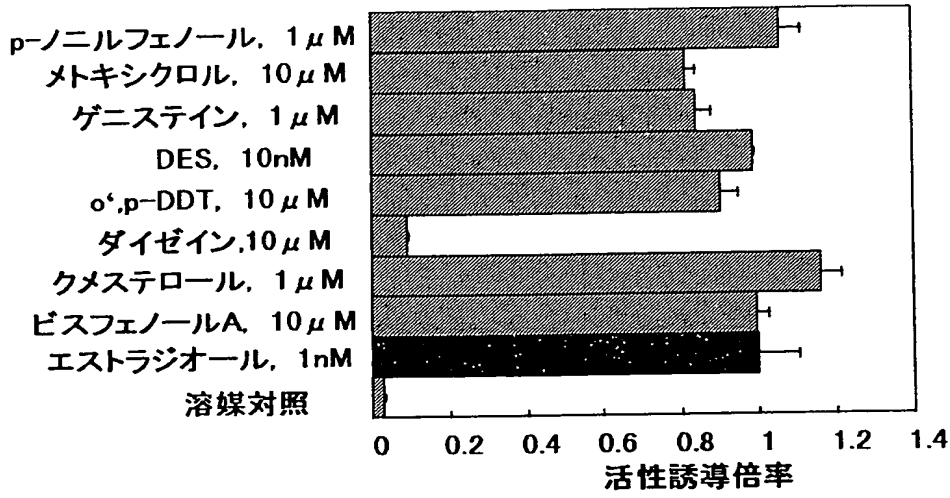


図 1 4

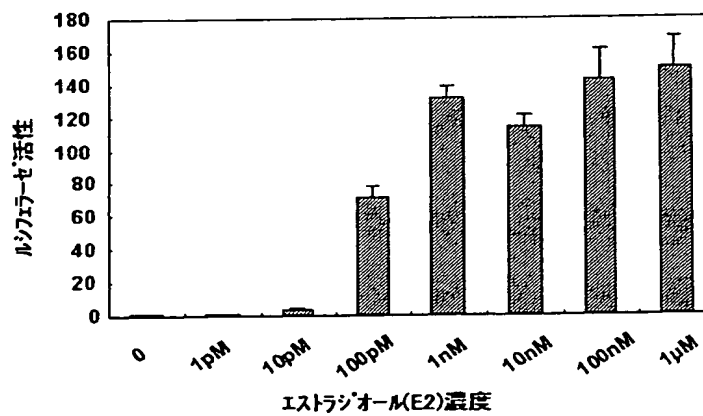


図 1 5

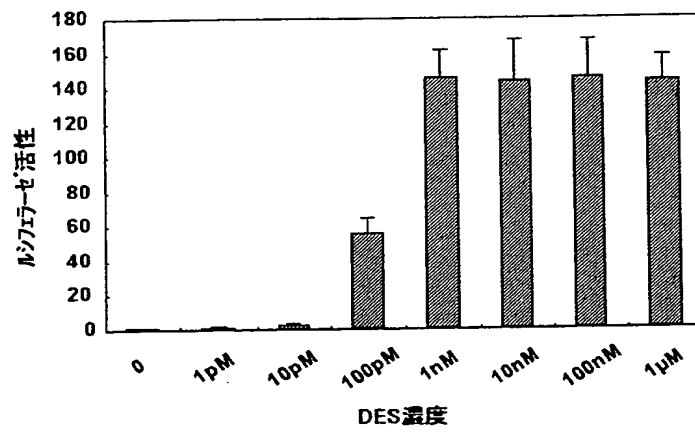


図 1 6

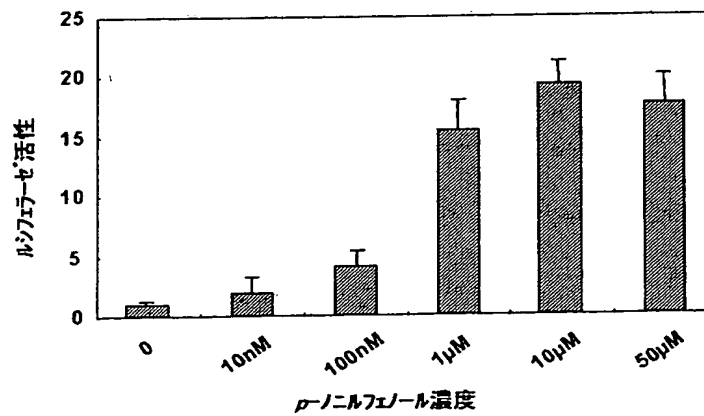


図 1 7

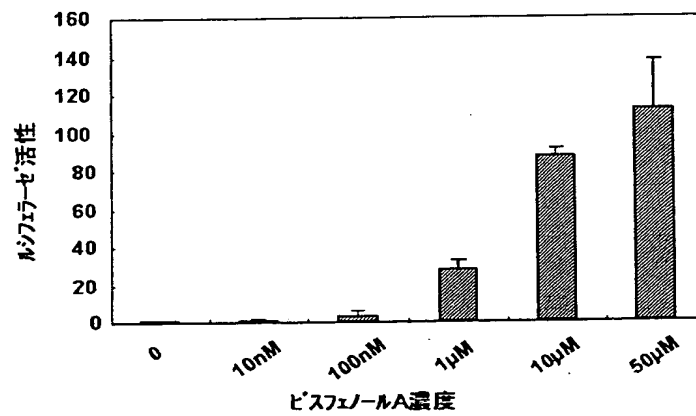


図 1 8

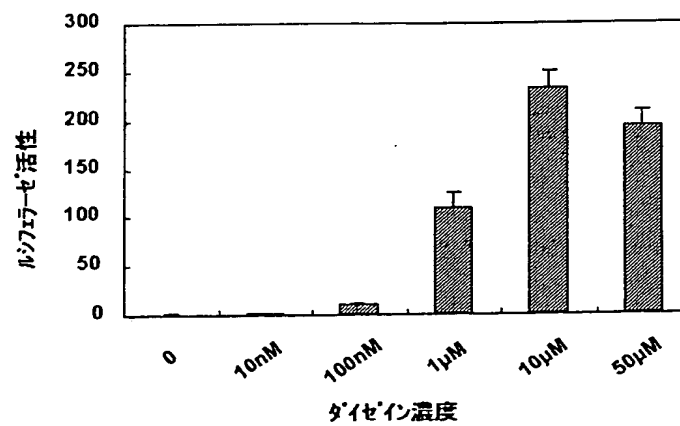




図 19

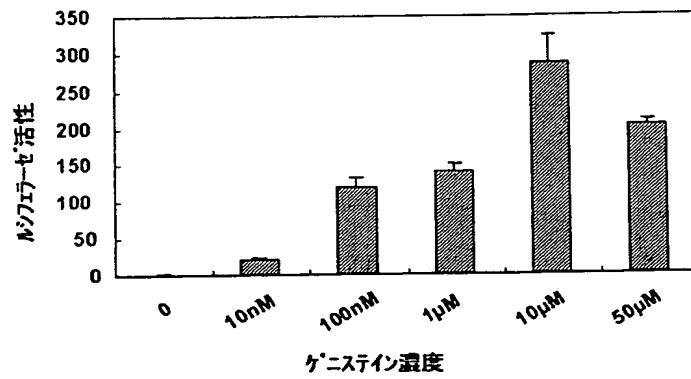


図 20

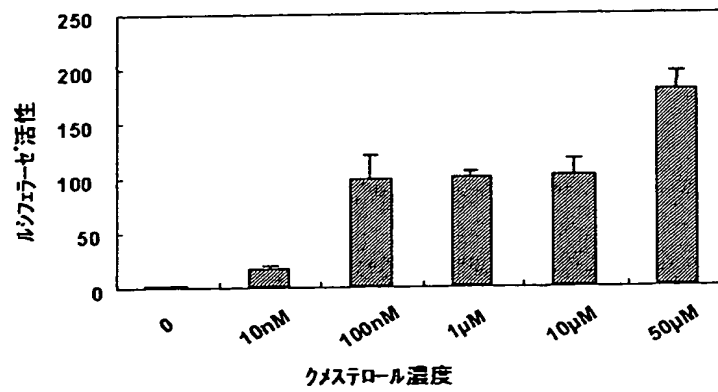


図 2 1

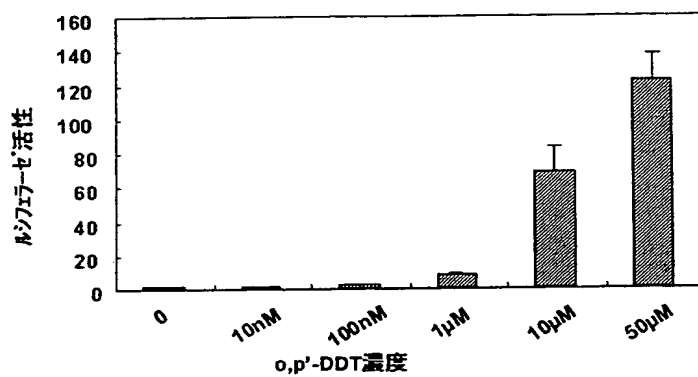


図 2 2

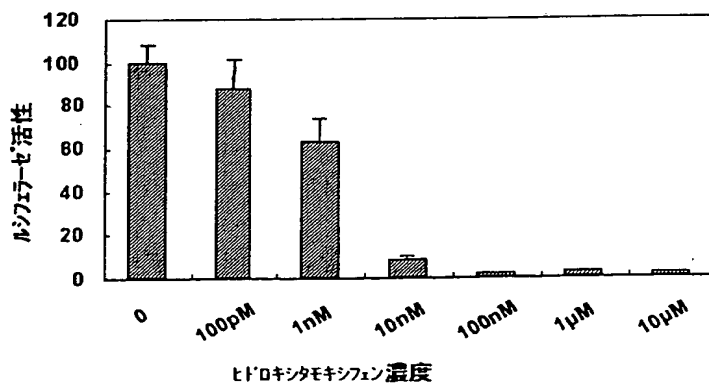


図 2 3

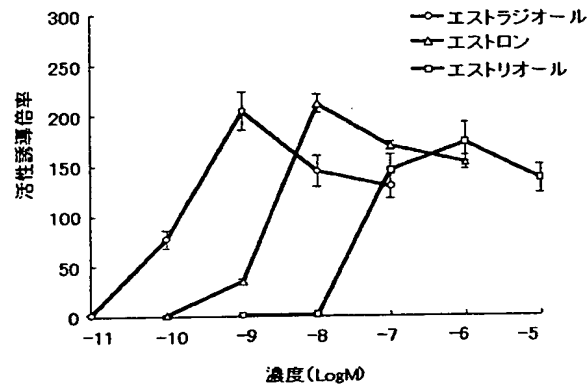


図 2 4

